Giovana De Nardo Maffazioli

**Avaliação do perfil de miRNAs circulantes em pacientes 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 Obstetrícia e Ginecologia

Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo Arantes
Rosa Maciel

Coorientador (a): Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

**(versão corrigida Resolução CoPGr-6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2021

Giovana De Nardo Maffazioli

**Avaliação do perfil de miRNAs circulantes em pacientes 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 Obstetrícia e Ginecologia

Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo Arantes
Rosa Maciel

Coorientador (a): Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Maffazioli, Giovana De Nardo
Avaliação do perfil de miRNAs circulantes em
pacientes com síndrome dos ovários policísticos /
Giovana De Nardo Maffazioli. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetria e Ginecologia.
Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.
Coorientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico
2.Resistência à insulina 3.Diabetes mellitus tipo 2
4.Dislipidemia 5.Metabolismo 6.Epigenética
7.microRNAs 8.Expressão gênica

USP/FM/DBD-089/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese a todas as participantes do estudo,
que, voluntariamente, se prontificaram em fornecer suas
informações clínicas e amostra de sangue para o
aprimoramento do conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edmund C Baracat, por sua liderança, suporte intelectual e infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel, por toda confiança, orientação, oportunidades e pela generosidade em todos os conhecimentos compartilhados. Concluo esta etapa com a certeza de que ganhei não só um ótimo mentor na pesquisa e na vida, mas um grande amigo.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho, grande cientista, muito obrigada pelas ricas discussões científicas, conhecimentos compartilhados e por me ensinar a conduzir os experimentos com tanto rigor e paciência. Seus ensinamentos foram fundamentais para minha formação acadêmica.

A todos os funcionários do LIM-58: Juciara Costa, Marinalva de Almeida, e Thiago Hideki pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho, e à toda a equipe de enfermagem do ambulatório de ginecologia do HCFMUSP, em especial à técnica de enfermagem Lourdes Meira, pela valiosa ajuda na coleta das amostras. Aos funcionários da Disciplina e do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia por todo apoio durante o doutorado.

Aos meus colegas de pós-graduação e parceiros de ambulatório, com os quais tive a honra de aprender e partilhar bons momentos, por toda a ajuda nos mais variados temas da ciência e da vida: Caroline Panone Lopes, Bruna Cristine de Almeida, Giulia Araújo, Edson Ferreira, Isadora Sengafredo, Laura Gonzales dos Anjos, Leonardo Tomiatti, Luísa Pimenta, Mariana Schaefer, Natalia Garcia, Renata Macchione, Rodrigo Marcondes e Vanessa Heinrich.

Ao Dr Alcione Macedo Almeida e à Dra Sylvia Hayashida, grandes médicos e amigos, muito obrigada por seus ensinamentos e por me acolher em seus ambulatórios.

A todos os meus professores, que contribuíram com a minha formação e, indiretamente, fizeram com que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, Juçara De Nardo Maffazioli e Mauro Sá Britto Maffazioli, por sonharem comigo, me darem raízes firmes e asas leves, capazes de vencer meus obstáculos. Ao meu irmão, Juliano De Nardo Maffazioli, pela grande torcida e incentivo. Ter uma família como essa na base de tudo me faz encarar desafios na certeza de que serei apoiada aonde quer que eu esteja.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação Faculdade de Medicina pelo apoio financeiro a esta pesquisa (processo FAPESP #2017/05552-2), e a FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (processo FAPESP #2016/23253-0).

Ao Grupo Fleury pelo financiamento e realização das análises do hormônio anti-mülleriano.

*“Digo: o real não está nem na saída nem na chegada:
ele se dispõe pra gente é no meio da travessia”*

Guimarães Rosa

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ALGORITMOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP)	2
1.2 Etiologia e Fisiopatologia da SOP	8
1.3 O Papel da Insulina na SOP	12
1.4 MicroRNAs como Biomarcadores e Mediadores de Doença	19
1.5 Biomarcadores na SOP	24
1.6 MicroRNAs como Biomarcadores e Mediadores de Doença na SOP..	27
1.7 Justificativa	29
 2 OBJETIVOS	 31
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
 3 MÉTODOS	 33
3.1 Participantes e Local do Estudo	34
3.2 Exames Laboratoriais	37

3.3 Ultrassonografia Transvaginal	38
3.4 Seleção dos miRNAs do Estudo	39
3.5 Coleta de Sangue Periférico e Preparo do Soro	40
3.6 Controle de Qualidade das Amostras de Soro	41
3.7 Extração de RNA Total	41
3.8 Reação de síntese da Cauda Poly (A)	43
3.9 Reação de Ligação do Adaptador.....	43
3.10 Reação da Transcrição Reversa.....	44
3.11 Reação do miR-Amp	45
3.12 Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	47
3.13 Técnica de qRT-PCR pela Plataforma <i>Open Array</i>	47
3.14 Análise dos Resultados das Técnicas de qRT-PCR pela Plataforma <i>Open Array</i>	51
3.15 Técnica de qRT-PCR para a Validação dos Resultados	53
3.16 Avaliação das Redes de Interação entre os miRNAs e seus Principais Alvos Moleculares Envolvidos com o Desenvolvimento de SOP e Disfunções Metabólicas	55
3.17 Análise Estatística	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Características Clínicas	58
4.2 Características Hormonais.....	61
4.3 Características Metabólicas.....	62
4.4 Análise de Expressão dos miRNAs	70

4.5 Análises de Curva ROC para a Discriminação do Grupo SOP em Relação ao Grupo Controle	75
4.6 Expressão do miR-21-5p em Função das Características Clínicas das Participantes.....	78
4.6.1 Sobrepeso/Obesidade.....	78
4.6.2 Hiperandrogenismo e Resistência à Insulina.....	79
4.6.3 Fenótipos da SOP.....	81
4.6.4 Critérios de Risco Metabólico.....	82
4.7 Redes de Interação e Análise de Enriquecimento entre o miR-21-5p e seus Principais Alvos Moleculares Envolvidos com o Desenvolvimento de SOP e suas Disfunções Metabólicas.....	85
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	103
7 ANEXOS	106
Anexo A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	107
Anexo B Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	110
Anexo C Protocolo de Avaliação Clínica e Laboratorial	113
Anexo D Exames Laboratoriais, Método de Análise e Valores de Referência.....	116
Anexo E Análise Completa de Enriquecimento de Processos Biológicos, Funções Moleculares e Vias de Sinalização.....	118
8 REFERÊNCIAS	129

APÊNDICES

LISTAS DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
ACTH	Hormônio Adenocoticotrófico
AE-PCOS	Sociedade de Excesso de Androgênios e Síndrome dos Ovários Policísticos
AGO2	Proteína Argonauta 2
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
ANCOVA	Análise de Covariância
ANOVA	Análise de Variância
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
AUC	Área sob a Curva
β	Beta
CA	Circunferência Abdominal
CAPPEsq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CIGMA	Infusão Contínua de Glicose com o Emprego de um Modelo Matemático
cm	Centímetros
COL4A1	<i>Collagen Alpha-1 (IV) Chain</i>
CQ	Circunferência do Quadril
CREPCOS	Centro de Excelência em Pesquisa na Síndrome dos Ovários Policísticos
CT	<i>Cycle of Quantification</i>
Δ	Delta

DENND1A	<i>Denn Domain-Containing Protein 1A</i>
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
Drosha	<i>RNase III Enzyme Drosha</i>
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i>
FAI	Índice de Androgênio Livre
FR	<i>Fold Regulation</i>
FOXO	<i>Forkhead Box</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHB	Subunidade Beta do Hormônio Folículo Estimulante
FSHR	Receptor de Hormônio Folículo Estimulante
FSIVGTT	Teste de Tolerância à Glicose Endovenosa com Coletas Múltiplas com Modelo Matemático Mínimo
GnRH	Hormônio Gonadotrófico
g	Grama
GLI/INS	Relação Glicemia/Insulinemia
GLUT4	Transportador de Glicose 4
HA	Hiperandrogenemia
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HDL-C	Colesterol na Lipoproteína de Alta Densidade
HI	Hirsutismo
HMGA2	<i>High Mobility Group AT-Hook 2</i>
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à Insulina
hsa	<i>Homo-sapiens</i>
IC	Intervalo de Confiança
IGF1	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>

INSR	<i>Insulin Receptor</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IQQ	Intervalo Interquartil
IRS1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
IU	Unidades Internacionais
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto
L	Litro
LAP	Produto de Acumulação Lipídica
LDL-C	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
LHGCR	Gene do Receptor do Hormônio Luteinizante
LIM 58	Laboratório de Investigação Médica 58
LMCS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectometria de Massa em Tandem
Log	Logaritmo
m²	Metro Quadrado
MAPK	Proteína Cinase Ativadora de Mitose
mg	Miligrama
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetro de Mercúrio
mHz	Mega Hertz
mmol	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
N	Número
NCEP/ATP III	<i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
ng	Nanograma
nl	nanolitro

NICHD	<i>Institute of Child Health and Human Development</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nmol	Nanomol
µL	Microlitro
µm	Micrometro
NOVA1	<i>NOVA alternative splicing regulator 1</i>
OG	<i>Gene Ontology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	DNA polimerase <i>hot-start</i>
PAP	Polimerase poli(A)
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI-3K	Fosfatidil-Inositol-3-Cinase
pmol	Pico moles
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
Pre-miRNA	microRNA precursor
Pre-mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro precursor
Pri-miR	Transcrito primário de miRNA
%	Porcentagem
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
QUICKI	Índice de Checagem Quantitativa de Sensibilidade à insulina
RI	Resistência à Insulina
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RQ	<i>Relative Quantification</i>
RT	Transcrição reversa
SC-BI	Receptores <i>scavenger</i> classe B tipo I
SHBG	Globulina Ligadora de Esteroides Sexuais
SDHEA	Sulfato de Deidroepiandrosterona

SM	Síndrome Metabólica
SMAD	<i>Mothers Against Decapentaplegic</i>
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGFBR2	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i>
TGL	Triglicerídeos
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
THADA	<i>Thyroid Adenoma Associated</i>
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
TSH	Hormônio Tireoestimulante
T4 Livre	Tiroxina Livre
UTR	Região Não Codificadora
VAI	Índice de Adiposidade Visceral
VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
VLDL-C	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
vs	<i>versus</i>
x	Vezes
xg	Força Gravitacional Centrífuga
3β-HD	3β- hidroxiesteroide dehidrogenase
17-OHP	17-Hidroxiprogesterona
25-OHD	25-Hidroxivitamina D
°C	<i>Graus Celsius</i>
>	Maior
<	Menor
=	Igual
±	Mais ou menos
≥	Maior ou Igual
≤	Menor ou Igual

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os Quatro Fenótipos da SOP de Acordo com Rotterdam	6
Figura 2	Fisiopatologia da SOP	12
Figura 3	Vias de Sinalização da Insulina	16
Figura 4	Estrutura do miRNA	21
Figura 5	Biogênese dos miRNAs.....	22
Figura 6	Escala de Ferriman-Gallwey para Avaliação do Hirsutismo.....	36
Figura 7	Esquema Representativo das Etapas de Conversão Seletiva de miRNAs maduros em cDNA.....	46
Figura 8	Representação Esquemática do chip do <i>Open Array</i>	48
Figura 9	Aparelho <i>Accufill</i> com a placa de 384 poços selada.....	50
Figura 10	Injeção da Solução no Chip do <i>Open Array</i>	51
Figura 11	Redes de Interação do miR-21-5p com seus 99 Alvos Moleculares.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios Diagnósticos da SOP	8
Tabela 2	Critérios de SOP de Acordo com o Consenso de Rotterdam	35
Tabela 3	miRNAs Seleccionados	39
Tabela 4	Características Clínicas dos Grupos SOP vs Controle	59
Tabela 5	Características Hormonais dos Grupos SOP vs Controle	62
Tabela 6	Características Metabólicas dos Grupos SOP vs Controle ...	63
Tabela 7	<i>Fold-Regulation</i> (FR) dos miRNAs Avaliados no Grupo SOP em Relação ao Grupo Controle	72
Tabela 8	Expressão Relativa dos miRNAs das Amostras dos Grupos SOP vs Grupo Controle	73
Tabela 9	Validação do Perfil de Expressão dos miRNAs Avaliados no Grupo SOP em Relação ao Grupo Controle Utilizando Duas Técnicas.....	74
Tabela 10	Verificação por Ontologia Genética (OG) dos Processos Biológicos e Funções Moleculares Associados com os Genes Alvos do miR-21-5p.....	88
Tabela 11	Verificações das Vias de Sinalização Encontradas em Análise nos Bancos de Dados Biomédicos KEGG e vias Wiki, Relacionados ao miR-21-5p.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Frequência dos Fenótipos no Grupo SOP.....	60
Gráfico 2	Diferenças na História Familiar entre os Grupos SOP vs Controle	60
Gráfico 3	Diferenças nas Curvas de Insulinemia e Glicemia nos Grupos SOP com e sem Resistência à Insulina.....	65
Gráfico 4	Diferenças na Frequência de Resistência à Insulina e Intolerância à Glicose entre os Grupos SOP e Controle.....	66
Gráfico 5	Diferenças na Frequência de Dislipidemia e Hipertrigliceridemia entre os Grupos SOP e Controle.....	67
Gráfico 6	Diferenças na Frequência de Síndrome Metabólica entre os Grupos SOP e Controle.....	68
Gráfico 7	Diferenças na Frequência dos Critérios para o Diagnóstico de Síndrome Metabólica entre os Grupos SOP e Controle....	68
Gráfico 8	Diferenças nos Valores Medianos de Insulinemia Baseados na Quantidade de Componentes da Síndrome Metabólica....	69
Gráfico 9	Diferenças na Frequência de Maior Risco Metabólico entre os Grupos SOP e Controle, classificadas de acordo com critérios distintos para a avaliação do risco metabólico.....	70
Gráfico 10	Diferenças de Expressão Relativa do miR-26a-5p e miR-21-5p entre os Grupos SOP e Controle.....	75

Gráfico 11	Comparação entre as Curvas ROC do miR-21-5p e do Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) para a Discriminação do Grupo SOP e Controle.....	76
Gráfico 12	Curva ROC Demonstrando a Combinação do miR-21-5p e do AMH para a Discriminação dos Grupos SOP e Controle	77
Gráfico 13	Expressão do miR-21-5p em Subgrupos SOP e Controle de Acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC).....	78
Gráfico 14	Expressão do miR-21-5p no Grupo Controle e Subgrupos SOP de acordo com a Presença de Hirsutismo e Hiperandrogenemia.....	80
Gráfico 15	Expressão do miR-21-5p em Subgrupos SOP e Controle de Acordo com a Resistência à Insulina e a Globulina Ligadora dos Esteroides Sexuais.....	81
Gráfico 16	Expressão do miR-21-5p entre os Fenótipos A-C e o Fenótipo D da SOP.....	82
Gráfico 17	Expressão do miR-21-5p entre os Grupos Controle e SOP sem e com Síndrome Metabólica.....	83
Gráfico 18	Expressão do miR-21-5p nos Grupos SOP e Controle de Acordo com a Relação Triglicerídeos/HDL-C.....	84
Gráfico 19	Expressão do miR-21-5p nos Grupos SOP e Controle Classificados Utilizando Critérios Distintos para a Avaliação do Risco Metabólico.....	85

LISTA DE ALGORITMOS

Algoritmo 1	Algoritmo, Demonstrando os miRNA Seleccionados para Estudo	71
--------------------	---	----

RESUMO

Maffazioli, GD. *Avaliação do perfil de miRNAs circulantes em pacientes com síndrome dos ovários policísticos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma endocrinopatia complexa e heterogênea caracterizada por anovulação crônica e hiperandrogenismo. Afeta de 5 a 17% das mulheres em idade reprodutiva, apresenta alterações reprodutivas e metabólicas e se associa, frequentemente, a obesidade, infertilidade e resistência à insulina. A etiologia da SOP ainda é pouco compreendida, mas sabe-se que apresenta traço genético associado a fatores epigenéticos. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes responsáveis pela regulação de inúmeras funções do organismo. Estão presentes em diversos órgãos e fluidos corporais. No soro, circulam dentro de pequenas vesículas ou livres no plasma e são relativamente estáveis e facilmente detectáveis. Dessa forma, têm despertado interesse tanto como potenciais biomarcadores, quanto como moléculas reguladoras de doenças. O objetivo desse estudo é avaliar a expressão de 201 miRNAs circulantes relacionados com a SOP bem como com disfunções no metabolismo da insulina e glicose em 36 mulheres com SOP e compará-lo ao perfil de 16 mulheres controles sem SOP. Dados clínicos, antropométricos, hormonais e metabólicos foram avaliados. Os perfis de 201 miRNAs circulante foram avaliados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) por meio da plataforma *Open Array*, e os miRNAs que se apresentaram como mais promissores foram validados por meio de qRT-PCR com a utilização de ensaios *Taqman* individuais. Os dados, então, foram submetidos à análise estatística e de bioinformática. Os grupos SOP e controle estavam pareados para a idade ($p=0,16$) e etnia ($p=0,87$). O grupo SOP apresentou maior índice de massa corporal (IMC) ($p=0,03$), circunferência abdominal ($p=0,001$), grau de hirsutismo ($p=0,0001$), hiperandrogenismo laboratorial ($p=0,02$) e pior perfil metabólico em relação ao controle. Dos 201 miRNA selecionados, 95 apresentaram expressão suficiente para prosseguir com as análises. Destes, 14 mostraram tanto diferenças de *fold-regulation* e de expressão relativa significativas entre os dois grupos. Desses 14, foram escolhidos 7 miRNAs que apresentaram amplificação no maior número de amostras para a etapa de validação. Após esta etapa, o miR-21-5p mostrou-se como o miRNA mais promissor e prosseguiu para a análise junto com os dados clínicos. Este miRNA apresentou chance de 81% para discriminar o grupo SOP da população do estudo, que foi semelhante à chance do hormônio anti-mulleriano (AMH), molécula amplamente estudada e promissora como biomarcador de SOP. Além disso, essa diferença de expressão entre SOP e controle pareceu estar relacionada parcialmente com o hiperandrogenismo e com a relação triglicérides/HDL-C, ainda que os mecanismos relacionados a essas associações não foram elucidados. O miR-21-5p mostrou alto potencial de aplicabilidade clínica no diagnóstico de SOP. Este estudo, portanto, pode contribuir para o uso mais racional e objetivo de marcadores que possam ser utilizados no diagnóstico da síndrome, bem como na predição de alterações metabólicas e reprodutivas.

Descritores: Síndrome do ovário policístico; Resistência à Insulina; Diabetes mellitus Tipo 2; Dislipidemia; Metabolismo; Epigenética; microRNAs; Expressão Gênica.

ABSTRACT

Maffazioli, GD. *Evaluation of circulating miRNAs profile in patients with polycystic ovary syndrome*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a complex and heterogeneous endocrinopathy characterized by chronic anovulation and Hyperandrogenism. It affects from 5 to 17% of reproductive aged women, and presents reproductive and metabolic dysfunctions associated to obesity, infertility and insulin resistance. The etiology of PCOS is still poorly understood, but it is known that it is related to a complex genetic trait associated with epigenetic factors. miRNAs are small non-coding molecules involved in the regulation of many body functions. These molecules were found in a variety of organs and body fluids. In the serum, they circulate inside small vesicles or free, and are relative stable and easily detected. Therefore, they are raising attention not only as potential biomarkers, but also as disease regulatory molecules. The aim of this study is to evaluate the expression profile of 201 circulating miRNA associated to PCOS, as well as insulin and glucose metabolic dysfunctions in a population of 36 PCOS women and 16 healthy controls. Clinical, anthropometric, hormonal and metabolic data were recorded and evaluated. The expression profile of the 201 circulating miRNAs selected were analyzed by quantitative real time polymerase chain reactions (qRT-PCR) using the Open Array platform. miRNAs that have shown to be the most promise were validated by the use of individual Taqman assays through qRT-PCR. Statistical and bioinformatics analyzes were performed. PCOS and control groups were matched by age ($p=0.16$) and ethnicity ($p=0.87$). As expected, PCOS group presented higher body mass index (BMI) ($p=0.03$), waist circumference ($p=0.001$), hirsutismo score ($p=0.0001$), hyperandrogenemia ($p=0.02$) and worse metabolic profile when comparing to the control group. From the 201 miRNAs selected, 95 presented enough expression to proceed with the analyzes. From these, 14 presented both significant fold-regulation and relative expression. between the two groups. From these, 7 miRNAs were selected, based on the quantity of samples they were expressed, to proceed to the validation step. After this, the miR-21-5p presented as the most promising miRNA in our sample and were analyzed along with clinical data. This miRNA had 81% chance of discriminating the PCOS group from control group, it was similar with the chance presented by the anti-mullerian hormone (AMH), widely studied as a promising biomarker of PCOS. Furthermore, this difference of expression seemed to be related to hyperandrogenism and triglycerides/HDL-C rate, even though the mechanisms related to these association were not elucidated. miR-21-5p showed high potential of clinical applicability in the PCOS diagnosis. This study, thus, may contribute to a more rational and objective use of biomarkers that may be used in PCOS diagnosis, as well as in the prediction of its metabolic and reproductive disfunctions.

Descriptors: Polycystic Ovary Syndrome; Insulin Resistance; Type 2 Diabetes; Dyslipidemia; Metabolism; Epigenetics; microRNAs; Gene Expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP)

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma endocrinopatia complexa, que afeta entre 5 e 17% das mulheres em idade reprodutiva, a depender da população estudada e do critério diagnóstico utilizado¹⁻⁵. Sua etiologia não é totalmente conhecida, mas sabe-se que apresenta componente genético complexo com alto grau de hereditariedade^{6, 7}, bem com alterações epigenéticas⁸⁻¹⁰. Caracteriza-se por anovulação crônica, hiperandrogenismo e presença de ovários policísticos ao ultrassom¹¹. Associa-se, frequentemente, à infertilidade, resistência à insulina, obesidade e aumento de risco de doenças metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doença cardiovascular e dislipidemia¹²⁻¹⁴.

Do ponto de vista evolutivo, constitui um paradoxo, pois, apesar de ser causa de infertilidade, há milhares de anos persiste na história da humanidade¹⁵. Essa hipótese foi levantada por autores que realizaram estudos epidemiológicos em associação com dados do genoma humano na SOP, indicando prevalências semelhantes³ da síndrome e variantes genéticas comuns entre populações de diferentes etnias^{6, 16-21}. Algumas dessas alterações também foram encontradas em estudo de populações com diabetes mellitus tipo 2^{22, 23}. Supõe-se, portanto, que certas características da síndrome foram benéficas em tempos pré-históricos, e podem ter favorecido a sobrevivência dessas mulheres. O hiperandrogenismo tornou-as mais fortes e aptas a sobreviver em um ambiente adverso²⁴; enquanto a resistência à insulina diminuiu a necessidade do uso de

aminoácidos em períodos prolongados de escassez alimentar, preservando suas estruturas corporais²⁵.

Historicamente, uma das primeiras descrições da síndrome foi reportada por Antônio Vallisneri²⁶, em 1721, em relatos de casos isolados de mulheres inférteis com ovários aumentados e com aparência policística, e, em 1844 e 1855, foram descritos ovários escleróticos e policísticos por Aquiles Chereau e Rokitansky^{27, 28}. Entretanto, Irving Stein e Michael Leventhal, em 1935, foram os primeiros a descrever, de modo sistemático, um série de sete mulheres apresentando ovários policísticos e oligo/amenorreia²⁹. Apesar das pacientes apresentarem padrões menstrual e ovariano semelhantes, quatro delas eram também hirsutas, e três obesas, sugerindo que as características clínicas poderiam variar entre as pacientes. Esta condição passou a ser denominada de “Síndrome de Stein-Leventhal”²⁹.

A partir dos anos 50, entretanto, outros estudos descrevendo casos semelhantes surgiram^{30, 31}, associando algumas alterações hormonais e bioquímicas aos casos de oligoanovulação e ovários policísticos. Com o advento do radioimunoensaio, concluiu-se que aquela alteração era uma endocrinopatia que envolvia produção aumentada de androgênios e modificação do padrão de secreção de gonadotrofinas, principalmente de hormônio luteinizante (LH)³², sugerindo haver heterogeneidade clínica, hormonal e bioquímica nas mulheres com a síndrome. A partir desses estudos, os termos “Doença dos Ovários Policísticos” e “Síndrome dos Ovários Policísticos” começaram também a ser empregados, sendo que este último passou a ganhar força e ser o termo dominante a partir do final dos anos 80³³. Recentemente, o nome da síndrome tem sido alvo de discussão, uma vez que além de dar ênfase ao seu aspecto

reprodutivo, foca em apenas um de seus critérios diagnósticos, o ovário policístico, o qual nem sempre está presente. Devido a isso, especialistas têm proposto a mudança de nomenclatura para que englobe tanto reprodução quanto metabolismo, como por exemplo, “Síndrome Metabólico-Reprodutiva”³⁴. Apesar disso, a adoção de uma nova terminologia não é ainda consenso e deve ser melhor e amplamente discutida.

Com o intuito de formalizar a nomenclatura e estabelecer, por meio de um critério diagnóstico, um fenótipo que proporcionasse melhor entendimento da fisiopatologia da síndrome, foi realizada, no início dos anos 90, uma conferência de especialistas patrocinada pelo *National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)*³⁵. A partir dela, a SOP ficou definida como uma anovulação hiperandrogênica de causa não bem entendida, caracterizada pela presença de hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial e oligoanovulação crônica, após a exclusão de outras causas relacionadas. Apesar de não ter sido proposta nenhuma sugestão específica para a avaliação de hiperandrogenismo clínico ou bioquímico, a oligoanovulação crônica foi determinada como a presença de seis ou menos ciclos menstruais por ano.

Esses critérios, também conhecidos como critérios do *National Institute of Health (NIH)* de 1990, serviram como base para o diagnóstico da síndrome por mais de uma década, até que, em 2003, devido aos avanços do conhecimento científico, um novo consenso foi realizado na cidade de Rotterdam, buscando uma nova definição que atendesse melhor as necessidades da clínica e da pesquisa. Segundo este consenso³⁶, patrocinado pelas *European Society for Human Reproduction and Embriology* e a *American Society for Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM)*, os critérios diagnósticos foram expandidos a fim de

incluírem pelo menos dois dos três: (a) oligo ou anovulação crônica, (b) sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo, e (c) ovários de padrão policísticos ao ultrassom, após a exclusão de outras causas relacionadas. Esses critérios ficaram conhecidos como os critérios do Consenso de Rotterdam.

Nesse consenso, houve melhor definição do que seria considerado uma boa medida para a avaliação de hiperandrogenismo. Ficou estabelecido, então, que o hirsutismo seria o principal marcador clínico de excesso de androgênios. A acne e a alopecia androgênica, outras alterações comuns desses estados, não foram consideradas indicadores clínicos se encontradas isoladamente. Apesar das limitações em se definir excesso de androgênios séricos na mulher, foram sugeridas como medidas sensíveis a dosagem de testosterona livre (quando realizada por diálise de equilíbrio) e o índice de androgênio livre (FAI) (calculado a partir das dosagens de testosterona total e da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG)). Quanto ao padrão policístico do ovário, foi determinado como critério diagnóstico a presença de 12 ou mais folículos com 2-9 mm de diâmetro ou volume ovariano $\geq 10\text{mL}$ em pelo menos um ovário.

O Consenso de Rotterdam expandiu os critérios diagnósticos da síndrome, e também propôs quatro fenótipos distintos baseados nas diferentes combinações dessas características (Figura 1). Um dos fenótipos, caracterizado pela presença de ovários policísticos e anovulação crônica sem hiperandrogenismo, foi alvo de discussão entre os especialistas, uma vez que sua inclusão aumentou a sensibilidade diagnóstica, deixando dúvidas se essas pacientes estariam expostas aos mesmos riscos reprodutivos e metabólicos que os demais grupos. Estudos a esse respeito ainda são controversos³⁷. Posteriormente, em 2006, a *Androgen Excess-PCOS Society (AE-PCOS)*

Society) sugeriu que a presença de hiperandrogenismo (clínico e/ou bioquímico) deveria ser item obrigatório para o diagnóstico, além da presença de oligo/anovulação e/ou ovários policísticos ao ultrassom^{38, 39}.

Figura 1 – Os quatro fenótipos da síndrome dos ovários policísticos (SOP) de acordo com o consenso de Rotterdam. Fenótipo A: hiperandrogenismo + irregularidade menstrual + ovário de padrão policístico; Fenótipo B: hiperandrogenismo + irregularidade menstrual; Fenótipo C: hiperandrogenismo + ovário policístico; Fenótipo D: irregularidade menstrual + ovário policístico.

Na medida em que o Consenso de Rotterdam passou por um processo de amadurecimento e com bases em evidências mais atuais, novas diretrizes para o diagnóstico de SOP foram propostas pelo *The Centre for Research Excellence in Polycystic Ovary Syndrome (CREPCOS)* australiano, com apoio da *ESHERE* e *ASRM*, em colaboração com outras sociedades internacionais¹¹. As recomendações decorrentes deste esforço multinacional, não só endossaram

os critérios de Rotterdam como também detalharam melhor cada um dos critérios diagnósticos da SOP.

A irregularidade menstrual foi definida como a presença de ciclos menores do que 21 e maiores do que 35 dias e/ou uma frequência menor do que 8 ciclos por ano. As dosagens de testosterona livre e FAI continuaram sendo recomendadas como preferíveis na avaliação bioquímica de hiperandrogenismo; agora, foi proposto que as diferenças étnicas também devem ser levadas em consideração na avaliação do hirsutismo. O grupo manteve o ultrassom transvaginal como o principal método para a medida dos ovários, sendo que o aparelho com uma frequência de banda de 8MHz é preferível. A contagem de folículos por ovário maior do que 20 e/ou um volume ovariano maior do que 10 mL é indicativo de morfologia policística. Em aparelhos com menor frequência, ou quando o ultrassom for realizado por via transabdominal, a recomendação é que apenas o volume ovariano > 10mL deve ser considerado. Além disso, as presenças de cistos, corpo lúteo ou folículos dominantes devem ser excluídas antes que o volume ovariano seja estabelecido. Apesar da intensa discussão quanto à melhor definição para síndrome, sua fisiopatologia não foi abordada nesses consensos.

Tabela 1 – Critérios Diagnósticos da Síndrome dos Ovários Policísticos

NIH 1990	Rotterdam (ESHRE/ASM) 2003*	AE-PCOS Society 2006	CREPCOS 2018*
Hiperandrogenismo (Clínico e/ou Bioquímico)	Hiperandrogenismo (Clínico e/ou Bioquímico)	Hiperandrogenismo (Clínico e/ou Bioquímico)	Hiperandrogenismo (Clínico e/ou Bioquímico)
Oligoanovulação (≤ 6 ciclos/ano)	Oligoanovulação	Oligoanovulação e/ou Ovários Policísticos)	Oligoanovulação (<8 ciclos/ano)
	Ovários Policísticos (≥ 12 folículos 2-9 mm/ volume > 10 mL)		Ovários Policísticos (≥ 20 folículos 2-9 mm/ volume > 10 mL)
*Pelo menos dois dos três critérios Após a exclusão de outras causas (todos)			

1.2 Etiologia e Fisiopatologia da Síndrome dos Ovários Policísticos

Assim como ocorreu com a caracterização diagnóstica da síndrome, suas etiologia e fisiopatologia também foram intensamente discutidas ao longo dos anos, apresentando difíceis definições. Entretanto, é bem estabelecido que a característica policística dos ovários é consequência de um quadro de anovulação crônica persistente⁴⁰. Como existem múltiplas causas de anovulação, podem haver várias causas de ovários policísticos, as quais resultam em um quadro clínico semelhante. O ovário policístico é consequência de um desarranjo de vários sistemas, e não de uma causa central ou local específica. Esses desarranjos são consequências de fatores genéticos, associados a fatores ambientais ou adquiridos, como, por exemplo, estilo de vida sedentário e hábitos dietéticos ocidentalizados¹⁵, levando a um quadro de hiperandrogenismo, disfunção ovulatória, resistência à insulina e inflamação de baixo grau.

Em 1935, Stein e Leventhal já cogitaram que a aparência policística dos ovários resultaria de distúrbios hormonais consequentes a um estímulo anormal

da hipófise anterior²⁹. Estudos subsequentes demonstraram que, na mulher adulta com SOP, a secreção de LH apresenta alterações na sua frequência de pulso e amplitude, aumentando as concentrações séricas médias dessa gonadotrofina em relação a mulheres controles^{32, 41, 42}, e um aumento relativo em relação ao hormônio folículo estimulante (FSH)^{31, 43}. As alterações foram associadas, em parte, a variantes genéticas nos genes dos receptores de LH (*LHCGR*) e FSH (*FSHR*) e da subunidade beta do FSH (*FSHB*)^{6, 16, 17, 44, 45}. Outros estudos identificaram que variações genéticas nos genes *THADA* e *DENND1A* também foram associadas ao aumento da relação LH/FSH^{16, 46}. Além dessas alterações genéticas, sugere-se que essa mudança de padrão seja também consequência de um aumento na frequência de pulso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), decorrente de concentrações cronicamente aumentadas de estrogênios e levemente aumentadas de inibina B (hormônio derivado de folículos pequenos) e, possivelmente, de hormônio anti-mülleriano (AMH)⁴⁷⁻⁵¹. além da ausência de pico de progesterona na segunda fase do ciclo³⁹.

Concentrações aumentadas de androgênios também podem contribuir para este padrão anormal de secreção de GnRH e de gonadotrofinas na síndrome. Alguns estudos em modelos animais indicam que uma exposição pré-natal a concentrações aumentadas de androgênios pode afetar a programação do pulso gerador de GnRH, predispondo a alteração na frequência de pulso e na secreção de gonadotrofinas⁵¹⁻⁵⁴. Logo, a hiperandrogenemia persistente com início na vida fetal, na adolescência ou na vida adulta, por causas diversas, seria capaz de induzir anormalidades na secreção do GnRH e, conseqüentemente, de gonadotrofinas, o que levaria a um estado crônico de hiperandrogenismo e de

anovulação. Esses estudos sugerem, portanto, que fatores epigenéticos também podem influenciar na etiologia da síndrome.

Apesar de o padrão de secreção de gonadotrofinas ter papel importante na fisiopatologia da síndrome, existe um subgrupo de mulheres com SOP que apresenta ciclos menstruais regulares, ovários de padrão policístico e aumento da concentração de androgênios, sem que o padrão de secreção de LH esteja alterado⁵⁵. Esses achados sugerem que, apesar da importância do aumento da secreção de LH na fisiopatologia do desenvolvimento folicular e da anovulação na SOP, essa não é a causa única do ovário policístico nem do aumento da produção androgênica.

Outros mecanismos responsáveis pelo aumento da produção androgênica na SOP incluem o incremento de fatores que potencializam a ação do LH nas células da teca ovariana^{56, 57} (como a insulina, por exemplo), bem como o aumento da sensibilidade dessas células ao estímulo do FSH e do LH⁵⁸. Sugere-se que o aumento na sensibilidade celular ocorra devido a uma alteração intrínseca de enzimas que agem na esteroidogênese, como a 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenase (3 β -HD) e a 17,20 liase^{59, 60}, aumentando a síntese androgênica. Recentemente, variação de expressão do gene *DENND1A* na célula da teca ovariana foi descrita como outro possível mecanismo do aumento da produção de androgênios nessas células em mulheres com SOP^{16, 61}.

Independente do mecanismo envolvido, a elevação da concentração local de androgênios favorece a ação da 5 α -redutase, que converte testosterona em di-hidrotestosterona, a qual não pode ser aromatizada em estrogênios⁶². Somado a isso, há uma produção aumentada de AMH pelas células da granulosa

nos folículos ovarianos de mulheres com SOP⁶³. Entre várias outras ações, acredita-se que este hormônio antagoniza o efeito do FSH sobre os folículos pequenos, demonstrado pela falta de estrogenização e dominância desses folículos, apesar de uma disponibilidade de FSH adequada⁶³⁻⁶⁶.

Como consequência a este microambiente ovariano androgênico, ocorre uma disfunção da dinâmica folicular desde estados precoces até os de folículos antrais e periovulatórios⁶⁷, resultando na formação de múltiplos cistos foliculares e na hiperplasia de células da teca⁶⁸. Com o tempo, esses folículos tornam-se atresícos e contribuem para a expansão do estroma ovariano, que aumenta de volume, aumentando a massa produtora de androgênios. As alterações na dinâmica folicular foram confirmadas por estudos da histologia ovariana na SOP, os quais demonstraram um excesso de folículos em crescimento tanto pré-antrais (primordiais e primários), quanto antrais, além de um aumento do estroma ovariano, com hiperplasia das células da teca⁶⁹.

As suprarrenais também contribuem para o excesso de androgênios na SOP, potencializando esse quadro⁷⁰. A prevalência do excesso de androgênios de origem adrenal na síndrome é de 20 a 30%³⁹.

Figura 2 – Fisiopatologia da Síndrome dos Ovários Policísticos. Padrão alterado de secreção de gonadotrofinas, hiperinsulinemia e disfunção de enzimas ovarianas levam ao aumento da produção androgênica, resultando no padrão policístico ovariano e no aumento dos níveis séricos de androgênios livres. O aumento da ação periférica desse hormônio na unidade pilo-sebácea, leva ao quadro clínico característico de hirsutismo e acne. A resistência periférica à insulina e a hiperinsulinemia compensatória também participam da fisiopatologia da síndrome, potencializando a ação do LH nas células da teca ovariana e a queda do SHBG, o que contribui para o quadro de hiperandrogenismo.

1.3 - O Papel da Insulina na Síndrome dos Ovários Policísticos

A importância da ação da insulina na patogênese da SOP foi primeiramente descrita por Burghen em 1980⁷¹, que encontrou correlações significativas entre os níveis plasmáticos basais de insulina, androstenediona e testosterona independente da obesidade em mulheres com SOP. Além disso, outros estudos demonstraram aumento da prevalência de *acantose nigricans* nessas mulheres

em relação a controles, sugerindo que o aumento da concentração plasmática de insulina na síndrome era possivelmente secundário a um quadro de resistência à insulina^{72, 73}. Desde então, houve aumento significativo de pesquisas investigando o papel da resistência à insulina e da hiperinsulinemia compensatória na patogênese da síndrome⁷⁴.

Embora não faça parte dos critérios diagnósticos, a hiperinsulinemia secundária à resistência à insulina está presente em 50 a 75% das mulheres com SOP.^{13, 75-77}. Apesar dessa prevalência ser maior em mulheres obesas (essas correspondem a 50 a 60% das mulheres com SOP), o grau de resistência à insulina na SOP é maior do que aquele predito pela obesidade e pode ocorrer também em mulheres com índice de massa corporal (IMC) normal^{39, 78}.

A insulina, secretada pelas células β pancreáticas, desempenha papel importante em diversas funções do organismo. É responsável não só pela regulação da homeostase da glicose, como também pela supressão da lipólise e proteólise, pela estimulação da síntese proteica, expressão gênica e mitogênese⁷⁹. A resistência insulínica é definida classicamente como uma diminuição na habilidade da insulina em mediar suas ações metabólicas de produção e absorção de glicose e de diminuição da lipólise, resultando em uma necessidade de maiores concentrações de insulina para o desempenho dessas funções⁸⁰. Essa resistência é decorrente de diminuição da resposta celular à insulina (ou da sensibilidade à insulina), que pode ser secundária a alterações tanto da ligação deste hormônio ao seu receptor, quanto de eventos pós-receptor, como por exemplo, alterações no transportador de glicose responsivo à insulina GLUT4 e nas vias de sinalização intracelular^{80, 81}. Existem duas principais vias de sinalização pós-receptor de insulina. A via fosfatidil-inositol 3

cinase (PI-3K) é responsável por mediar os efeitos metabólicos da insulina; enquanto a via da proteína cinase ativadora de mitose (MAPK) é responsável por mediar as ações proliferativas desse hormônio⁸².

A causa da resistência à insulina na SOP não é ainda inteiramente compreendida. Dada a complexidade e a natureza poligênica dessa desordem, evidências sugerem que mais de um mecanismo possa estar envolvido^{83, 84}. Alguns estudos demonstraram que mutações no gene do receptor de insulina (*INSR*)^{16, 85} e no gene *HMGA2*^{16, 45}, também descrito em estudos genéticos no diabetes mellitus tipo 2^{86, 87}, estão presentes em populações com SOP e podem contribuir para a fisiopatologia da resistência à insulina. Outro estudo demonstrou haver diminuição significativa do transportador de glicose responsivo à insulina GLUT4 em adipócitos de mulheres com SOP, diminuindo a responsividade celular do tecido à insulina⁸⁸. Entretanto, este resultado não foi replicado em estudo posterior⁸⁹. Apesar disso, outras pesquisas sugeriram que defeitos pós-receptor pudessem estar implicados na resistência à insulina, uma vez que esta pareceu ser seletiva e tecido específica na SOP. Enquanto existe uma resistência à ação da insulina tanto no metabolismo de carboidratos quanto de lipídeos, parece haver uma preservação ou melhora da atividade mitogênica em fibroblastos, nas suprarrenais e nas células da teca e granulosa ovarianas^{90, 91}, sugerindo que ocorreria uma maior ativação da via MAPK em detrimento da via PI-3K^{84, 92}. Um possível evento pós-receptor que explicaria esse fenômeno é a diminuição da fosforilação de tirosina e aumento da fosforilação de serina em sítios específicos na molécula denominada substrato do receptor de insulina 1 (IRS1)⁹³. É importante ressaltar, entretanto, que os defeitos na ação da insulina tanto na SOP quanto no diabetes mellitus tipo 2 e na obesidade melhoram com

o controle glicêmico e com mudanças na dieta e no estilo de vida, sugerindo que mecanismos adquiridos, como os eventos epigenéticos, ao invés de eventos intrínsecos, podem estar envolvidos.

A hiperinsulinemia, ou o aumento da sensibilidade ovariana a níveis fisiológicos desse hormônio, estimula a produção de androgênios por diversos mecanismos. A insulina age potencializando a ação do LH nas células da teca ovariana, tanto por meio do seu receptor quanto do receptor do fator de crescimento insulinoide tipo 1 (IGF-1), quando em concentrações mais elevadas⁵⁶. Além disso, a insulina inibe a síntese hepática de SHBG, aumentando os níveis de androgênios livres, metabolicamente ativos⁹⁴. Outras evidências também apontam que a insulina pode influenciar diretamente na regulação hipotalâmica, favorecendo tanto a secreção de LH quanto do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), aumentando o estímulo sobre a produção androgênica no ovário e na suprarrenal, respectivamente^{95, 96}. Por fim, a insulina também parece exercer importante papel na esteroidogênese dessas glândulas, estimulando a atividade da enzima 17,20 liase^{59, 60}, com o consequente aumento da produção androgênica.

Figura 3 – As vias de sinalização da insulina PI-3K e MAPK estão representadas na figura. Em vermelho, estão assinaladas possíveis etapas alteradas na fisiopatologia da resistência à insulina na SOP. Fonte: modificado de Diamanti-Kandarakis and Dunaif ⁹³.

Além do relevante papel que desempenha na patogênese do hiperandrogenismo na síndrome, a resistência periférica à insulina e a hiperinsulinemia compensatória, em especial nos tecidos adiposos e muscular, contribuem para o aumento do risco metabólico, principalmente do desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia. Sabe-se que 15,7 a 47% das mulheres com SOP são intolerantes à glicose, e que 2 a 10% apresentam critérios para diabetes mellitus tipo 2^{77, 97, 98}. O diagnóstico de SOP, portanto, confere um aumento do risco cinco a dez vezes maior de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2⁹⁹.

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia também estão associadas à diminuição das concentrações de colesterol na lipoproteína de densidade alta (HDL-C) e aumento de triglicérides¹⁰⁰⁻¹⁰². Disfunções no metabolismo da insulina estão, portanto, relacionadas a um maior comprometimento metabólico global. A

dislipidemia, portanto, também é um achado comum em mulheres com SOP. Estima-se que, aproximadamente, 70% das pacientes apresentem pelo menos um dos valores de concentração sérica de lipídeos aumentado ou limítrofe¹⁰³.

Muitos métodos são utilizados para avaliar a sensibilidade e resistência à insulina em humanos. Atualmente, o clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico é considerado o padrão-ouro para a avaliação de resistência à insulina¹⁰⁴. Esse método utiliza a infusão intravenosa de insulina e glicose até que se alcance uma concentração de equilíbrio dinâmico das concentrações de glicose, a qual é utilizada para representar a sensibilidade periférica à insulina. Além dele, outros métodos que utilizam infusões intravenosas de glicose e/ou insulina foram utilizados em trabalhos científicos para a avaliação da dinâmica desses hormônios. Esses métodos incluem o teste de tolerância à insulina (ITT), a infusão contínua de glicose com o emprego de um modelo matemático (CIGMA) e o teste de tolerância à glicose endovenosa com coletas múltiplas com modelo matemático mínimo (FSIVGTT)¹⁰⁵. Entretanto, por se tratar de métodos invasivos, demorados e custosos, além de necessitarem de treinamento específico, são de difícil utilização na prática clínica.

Devido a isso, outras medidas e modelos matemáticos foram utilizados com o intuito de dar mais praticidade a esta avaliação. As dosagens da insulina e glicemia de jejum e a razão glicemia/insulina jejum (GLI/INS) também têm sido empregadas para avaliar a sensibilidade e resistência à insulina, bem como de intolerância à glicose, com sensibilidade e especificidade razoáveis¹⁰⁶. Entretanto, aproximadamente 40% dos indivíduos que desenvolvem diabetes apresentam tolerância normal à glicose com a dosagem de glicemia de jejum isolada¹⁰⁷. O modelo de avaliação da homeostase para aquilatar a resistência à

insulina (HOMA-IR)¹⁰⁸, o índice de checagem quantitativa de sensibilidade à insulina (QUICKI)¹⁰⁹ e o índice MATSUDA¹¹⁰ também são modelos utilizados para a avaliação de sensibilidade ou resistência à insulina. Esses modelos, apesar de apresentarem boas correlações com o clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico^{109, 111}, baseiam-se em uma relação linear entre os níveis séricos de insulina e de glicose, a qual é de fato, parabólica¹¹¹. Além disso, utilizam valores de referência arbitrários para as segregações entre indivíduos.

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) também é muito usado na prática clínica para a avaliação de tolerância à glicose e diabetes mellitus, além de possibilitar a determinação de sensibilidade à insulina. Consiste em medidas seriadas de glicose e insulina após sobrecarga de 75g a 100g de glicose¹¹². Apesar de ser o método de escolha na prática clínica, seus resultados podem ser influenciados pelo grau de inatividade física, estresse e motilidade intestinal de cada indivíduo, assim como, muitas vezes, sua realização não é bem aceita pelo paciente¹¹². Além disso, estima-se que apenas 30 a 40% dos indivíduos intolerantes à glicose desenvolvem diabetes ao longo do tempo¹¹³, sendo que este número ainda não é bem estabelecido na SOP.

Frente a essas limitações encontradas nas ferramentas de avaliação clínica de pacientes com disfunções do metabolismo da glicose e da insulina, e dada a relevância que esta determinação tem para a predição do risco metabólico, o desenvolvimento de novas técnicas que ajudem na identificação dessas pacientes de risco é de grande importância. Além disso, o fato de diferentes fenótipos da síndrome apresentarem o mesmo mecanismo de disfunção da insulina (quando presente), permite com que um mesmo teste possa ser utilizado para essa avaliação em diferentes fenótipos¹¹⁴.

1.4 - MicroRNAs (miRNAs) como Biomarcadores e Mediadores de Doença

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNAs não-codificadores, produzidas em todas as células do corpo, e estão associados à regulação epigenética pós-transcricional dos genes¹¹⁵. Sua descoberta veio auxiliar no entendimento de diversos mecanismos biológicos e fisiopatológicos como, por exemplo, na manutenção da homeostase metabólica¹¹⁶, obesidade e diabetes¹¹⁷. Os miRNAs foram descobertos no nematódeo *Caenorhabditis elegans* em 1993¹¹⁸ e, mais tarde, foram descritos em vertebrados e plantas. Atualmente, milhares de miRNAs foram identificados, sendo que o banco de dados de miRNAs conhecido como miRBase registra 2815 miRNAs maduros em humanos (janeiro 2021, <http://www.mirbase.org/>).

Essas moléculas atuam silenciando genes específicos por meio do emparelhamento com as regiões 3' UTRs do RNA mensageiro (mRNA) alvo¹¹⁹, interferindo na estabilidade ou na eficiência da tradução do transcrito¹²⁰. Esse fenômeno resulta em alterações na síntese proteica do gene alvo¹²¹. Além disso, alguns estudos sugerem que os miRNAs também atuam por vias não-canônicas, as quais produzem efeito oposto, ou seja, induzem à transcrição e tradução do mRNA^{122, 123}.

Acredita-se que os miRNAs representam de 1 a 5% do genoma humano, regulando significativamente a expressão gênica de mais de 30% dos genes codificadores¹²⁴. A interação miRNA-mRNA não precisa ser perfeita, ou seja, não há necessidade de que todos os nucleotídeos do miRNA estejam ligados ao mRNA. Essa característica de interação somada ao fato dos miRNAs

apresentarem sequências pequenas, permite que um único miRNA regule centenas de genes alvos distintos¹²⁵ ou, ainda, outros miRNAs¹²⁶. Desta maneira, os miRNAs regulam diversos processos biológicos como a proliferação, diferenciação celular, apoptose e metabolismo¹²⁷. Porém, quando apresentam expressão desregulada, contribuem para o desenvolvimento de diversas afecções, como câncer¹²⁸, doenças cardiovasculares¹²⁹ e metabólicas¹¹⁷.

A síntese dos miRNAs ocorre a partir de genes específicos ou de regiões intrônicas (não relacionadas à produção de proteínas)¹²⁴, e sua biogênese inicia-se com a transcrição dos genes de miRNA no núcleo celular a partir de transcritos de RNA não-codificadores mediados pela RNA polimerase II ou III¹³⁰. Esse miRNA primário (pri-miRNA) é composto por 70-90 nucleotídeos, formando estruturas secundárias, como as regiões “*stem*”, nas quais dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “*loop*” em que bases não complementares formam uma alça circular¹¹⁸ (Figura 4). O pri-miRNA é clivado no núcleo pelo complexo enzimático *Drosha*–*DGCR8*, formando o miRNA precursor (pre-miRNAs), contendo aproximadamente 60 nucleotídeos de comprimento. Os pre-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma através da ação da *Exportina-5*¹³¹.

Figura 4 – Estrutura do miRNA. Estrutura com as regiões “*stem-loop*” e miRNA maduro em vermelho. Fonte: modificado de Lee RC et al., 1993)

No citoplasma, os pre-miRNA são processados pela enzima *Dicer*, que remove a alça na estrutura *stem-loop*, deixando-o na forma “madura”, que contém aproximadamente 17-24 nucleotídeos. A molécula é, então, carregada juntamente com as proteínas AGO2, sendo incorporada ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). A partir daí, as duas fitas do miRNA são separadas. Uma dessas fitas permanece associada ao RISC (miRNA maduro), enquanto a outra sofre degradação¹³¹ (Figura 5).

proteínas carregadoras. Além disso, os miRNAs têm sido detectados em vários fluidos biológicos, incluindo sangue, urina, saliva, leite materno, lágrima, fluidos seminais, amniótico e cefalorraquidiano¹³⁷. Alguns estudos, ainda, demonstraram que as diferentes concentrações dos miRNAs nesses fluidos estão associadas com a progressão de doença^{138, 139}. Entretanto, a fonte dos miRNAs presentes nesses fluidos não é completamente compreendida. Acredita-se que, pelo menos em parte, esses miRNAs também podem ser originados de células lisadas ou danificadas¹⁴⁰. No soro, os miRNAs circulam dentro de pequenas vesículas extracelulares ou de forma livre, sendo facilmente detectáveis. Sua estabilidade neste fluido pode ser explicada, pelo menos em parte, não só pela associação com proteínas como a Argonauta-2 (AGO2)¹⁴¹, o HDL-C¹⁴² e a nucleofosmina-1¹⁴³, como também pelo seu acondicionamento em vesículas¹⁴⁴. Quanto à importação desses miRNAs circulantes por suas células-alvo, foi demonstrado que, no caso da ligação ao HDL-C, por exemplo, essas moléculas podem ser facilmente incorporadas pelas células por meio de receptores *scavenger* classe B tipo I (SC-BI)¹⁴². Essa ligação a proteínas capazes de serem incorporadas por tipos celulares distintos fortalece a hipótese de que esses complexos podem entrar e funcionar em células receptoras¹⁴⁰.

Independente do seu meio de transporte no sangue e em outros fluidos extracelulares, a descoberta de sua circulação nesses tecidos impulsionou o aparecimento de pesquisas que investigam o potencial dos miRNAs tanto como biomarcadores, quanto como mediadores de doenças. Dentre as várias vantagens da utilização dessas moléculas na prática clínica, está a possibilidade de aplicação de um método de diagnóstico e prognóstico de modo não-invasivo, bem como de maior personalização terapêutica. Além disso, são moléculas

estáveis, e sua expressão parece ser tecido e doença específica¹⁴⁵. Sua determinação, ainda, pode ser facilmente obtida por técnicas de altas especificidade e sensibilidade, facilmente padronizáveis, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)¹⁴⁶. Além disso, trata-se de uma alteração epigenética que é reversível tanto farmacologicamente quanto com alterações de estilo de vida, podendo ser utilizada para acompanhamento de progressão e regressão de doença.

1.5 - Biomarcadores na SOP

Como visto anteriormente, a SOP é uma doença complexa e multifatorial, cuja definição sofreu pelo menos três modificações ao longo dos anos^{35, 36, 38}. Além disso, seus critérios diagnósticos – que, de maneira geral, englobam anovulação crônica, hiperandrogenismo e ovários de padrão policístico - vêm sofrendo constantes atualizações¹¹ e ainda possuem limitações em relação à sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico da síndrome. Além disso, esses critérios, na maioria clínicos, abordam basicamente os aspectos reprodutivos da síndrome, excluindo suas características metabólicas, como, por exemplo, a resistência à insulina.

O padrão policístico e volume ovariano são limitados como marcadores da síndrome uma vez que dependem da disponibilidade e qualidade do aparelho, da qualidade técnica do operador e de características clínicas da mulher, como, por exemplo, idade, IMC e, para ser realizado pela via transvaginal, início da

atividade sexual^{11, 147}. Além disso, muitas mulheres sem SOP apresentam ovário de padrão policístico ao ultrassom¹⁴⁸, e algumas mulheres com a síndrome não possuem essa característica.

A anovulação crônica é, geralmente, caracterizada pela frequência menstrual, a qual nem sempre é bem relatada pela mulher e, algumas vezes, não representa necessariamente a ausência de ovulação, assim como ciclos regulares não a excluem¹⁴⁹. A dosagem da progesterona na segunda fase do ciclo, algumas vezes, é utilizada como auxílio nesse diagnóstico, mas é pouco prática, visto que só tem valor se realizada no momento correto, e pode variar em diferentes ciclos menstruais¹⁴⁹.

O hiperandrogenismo, presente em 80 a 85% das mulheres com SOP³⁹, é avaliado de duas formas diferentes: clinicamente, por meio, da presença de hirsutismo, principalmente; ou laboratorialmente, com a dosagem das concentrações séricas de testosterona. Sua avaliação clínica é limitada tanto por questões étnicas quanto por questões práticas como, por exemplo, a não utilização de método depilatório próximo ao momento da avaliação. A determinação da hiperandrogenemia também apresenta limitações importantes. A interpretação das concentrações de testosterona, principal androgênio secretado pelas células da teca, depende do método de dosagem utilizado. Apesar de a cromatografia líquida acoplada à espectrometria em massa em tandem (LMCS/MS) ser o padrão-ouro, os métodos mais utilizados são os imunoenaios automatizados, que são limitados quanto a sua precisão¹⁵⁰⁻¹⁵².

Além dessas limitações, a presença desses três critérios, em combinação ou isoladamente, não excluem outras doenças, havendo necessidade de solicitação de outros exames laboratoriais para que o diagnóstico definitivo da síndrome

seja estabelecido^{11, 153}. Outro fator a ser considerado é que o diagnóstico de SOP não pode ser realizado durante o uso de contracepção hormonal, uma vez que essas medicações alteram seus sinais e sintomas.

Alguns estudos vêm buscando determinar outros marcadores que participam da fisiopatologia da síndrome e que apresentem maior custo-efetividade tanto na elucidação diagnóstica, quanto na determinação do seu risco reprodutivo e/ou metabólico¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

Dentre esses biomarcadores, uma molécula de destaque é o AMH. Conforme mencionado anteriormente, esse hormônio, produzido pelas células da granulosa, participa da fisiopatologia da síndrome interferindo, periféricamente, na dinâmica folicular e, centralmente, na liberação de gonadotrofinas^{51, 63-65}. Sua concentração está aumentada em mulheres com SOP⁶³ e tem forte correlação com a contagem de folículos antrais medida pelo ultrassom^{147, 158}. Alguns estudos demonstraram que uma dosagem sérica de AMH maior do que 5 ng/mL (35,7pmol/L) pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico de SOP^{159, 160}. Sua dosagem é especialmente útil em adolescentes, nas quais o ultrassom apresenta limitações importantes, ou na indisponibilidade desse exame, ou, ainda, se há dúvidas quanto ao diagnóstico da síndrome. Além disso, este hormônio apresenta um valor em potencial na predição de resposta ao tratamento da infertilidade na SOP^{161, 162}.

Apesar do AMH ser um marcador relativamente estável, sua determinação também apresenta limitações: existe mais de uma forma de AMH na circulação, causando variações em seus valores, dependendo do imunoensaio utilizado^{163, 164}; sua molécula não é totalmente estável durante o período de armazenamento, além de haver uma grande variabilidade na sua concentração dependendo da

idade¹⁶⁵. Outro fator importante é a interferência do uso de contraceptivos orais, os quais podem suprimir seus valores em 30 a 50%¹⁶⁶.

Em relação ao risco metabólico da SOP, a principal determinante é a resistência à insulina. Esta, apesar de não fazer parte dos seus critérios diagnósticos, tem alta prevalência na síndrome sendo considerada um de seus marcadores fisiopatológicos chave. Além de ser associada ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2, alguns estudos mostraram que mulheres com SOP e resistência à insulina apresentam maior IMC, concentrações maiores de triglicerídeos e marcadores inflamatórios e menores de HDL-C e, portanto, maior risco cardiovascular^{154, 167}. Conforme mencionado anteriormente, apesar do clampeamento euglicêmico hiperinsulinêmico ser considerado o padrão-ouro para a avaliação de resistência à insulina¹⁰⁴, o HOMA-IR é o método mais utilizado para a determinação de resistência à insulina em estudos científicos, devido a sua praticidade¹⁰⁸. Entretanto, esse método não é isento de limitações. Além disso, a resistência à insulina na SOP apresenta particularidades quanto a sua fisiopatologia⁹³. Não há, até o presente, marcadores que identifiquem alterações mais específicas desta característica na síndrome.

1.6 - MicroRNAs como Biomarcadores e Mediadores de Doença na SOP

Embora o grau de hereditariedade da SOP seja relativamente alto, as alterações genéticas encontradas até o momento relacionadas com a síndrome em estudos de associação do genoma explicam menos de 10% dos casos⁷. Além disso, a SOP é um traço genético complexo e poligênico, e sua expressão

fenotípica e seus riscos associados também dependem de fatores ambientais ou adquiridos¹⁵, podendo ser modificados com mudanças no estilo de vida, por exemplo. Esses fatos sugerem, portanto, que alterações epigenéticas parecem ser importantes determinantes da doença^{8, 9}.

Dentre os mecanismos epigenéticos, que incluem metilação de genes, ação de histonas e miRNAs, o estudo dos miRNAs tem despertado grande interesse nos últimos anos. Esses estudos na sua maioria focaram na análise de expressão diferencial de miRNAs entre mulheres com SOP e controles utilizando os mais diferentes tipos de tecidos (soro, adipócito, fluido folicular, células da granulosa e células da teca)¹⁶⁸⁻¹⁷². Atualmente, aproximadamente 79 miRNAs já foram identificados como apresentando essa expressão diferencial¹⁷³, e seus padrões de expressão foram relacionados com as mais variadas características e comorbidades associadas à síndrome.

Dentre esses miRNAs, os descritos com padrão de expressão anormal no soro de mulheres com SOP destacam-se: miR-27b, miR-30c, miR-103, miR-146a, miR-155, miR-222, miR-320, miR-19b, miR-21, miR-27b, miR-93, miR-135a, miR-6767, miR-23a, miR-23b, miR-122, miR-202, família let-7, entre outros^{171, 174-179}. Nos adipócitos de mulheres com a síndrome, os principais miRNAs encontrados foram: miR-320, miR-93, miR-223, miR-25 e o miR-106b^{172, 180}. No fluido folicular e/ou nas células ovarianas, os miR-9, miR-18b, miR-21, miR-24, miR-29a, miR-132, miR-135a, miR-146a, miR-151, miR-222, miR-224, miR-320, miR-383, miR-518, miR-155 foram os mais comumente encontrados^{168, 169, 181, 182}.

Apesar desses achados, os resultados ainda são incipientes e heterogêneos entre os diversos estudos, e o papel que essas moléculas representam como

marcadoras ou mediadoras da síndrome ainda precisa ser melhor investigado. Algumas das possíveis explicações para as divergências encontradas incluem: número amostral insuficiente, diferentes etnias, idade, IMC, critérios de inclusão e parâmetros de comparação, além de aspectos mais técnicos como o tipo de análise ou os pontos de corte estabelecidos para a expressão diferencial¹⁷³. Devido aos resultados contrastantes e ao papel potencial que as alterações epigenéticas têm na fisiopatologia da SOP, é importante que pesquisas mais detalhadas sejam realizadas com o intuito tanto de replicar alguns desses achados em outras populações, quanto para melhor entender os potenciais mecanismos que esses ou outros miRNAs desempenham na síndrome e nas comorbidades associadas.

1.7 - Justificativa

Apesar da significativa prevalência da SOP, há ainda limitações quanto aos métodos diagnósticos, dificultado a identificação correta de muitas mulheres com a síndrome. Além disso, a SOP desempenha importante papel no estabelecimento de muitas complicações metabólicas, especialmente, quando associada à resistência à insulina e à hiperinsulinemia compensatória. Os mecanismos relacionados a essas alterações parecem diferir dos de mulheres sem a síndrome e, ainda, precisam ser elucidados. Frente a isso, o desenvolvimento de novos métodos mais específicos que ajudem tanto no diagnóstico da síndrome, quanto na identificação precoce de pacientes de maior risco metabólico, é de grande importância.

Alguns estudos têm reiterado o papel dos miRNAs na regulação da insulina¹³⁴, no desenvolvimento de ilhotas pancreáticas¹⁸³ e, indiretamente, no metabolismo de glicose e lipídeos¹⁸⁴. Esse fato sugere que também parecem atuar como reguladores do metabolismo na SOP.

Os miRNAs no soro são estáveis e refletem disfunções celulares de diversas doenças crônicas e podem espelhar o grau de comprometimento metabólico de mulheres com SOP numa fase que antecede o diabetes. A utilização dos miRNAs como marcadores de risco metabólico na prática clínica possibilitaria a redução de gastos em saúde, uma vez que pacientes com menor comprometimento metabólico seriam dispensadas de um acompanhamento mais rigoroso, enquanto as de maior risco teriam melhor seguimento (reduzindo gastos com potenciais internações e intervenções futuras). Além disso, a expressão diferencial dessas moléculas em mulheres com SOP levanta a possibilidade da identificação de potenciais mecanismos fisiopatológicos relacionados à síndrome, bem como, da busca por novos alvos terapêuticos para um tratamento mais personalizado.

Desse modo, propusemo-nos neste estudo, a analisar o perfil de miRNAs circulantes de mulheres com e sem a síndrome, e relacioná-los com as diversas características clínicas, especialmente resistência à insulina, buscando esclarecer o papel dessas moléculas no diagnóstico e na identificação de comorbidades associadas. Com esta finalidade, foram selecionados 201 miRNAs descritos na literatura como relacionados à SOP, implicados na expressão de genes ligados ao metabolismo da insulina, função das células β pancreáticas e diabetes mellitus tipo 2^{173, 185-188}.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Avaliar o perfil de expressão de microRNAs circulantes em mulheres com síndrome dos ovários policísticos e compará-lo ao de mulheres sem a síndrome.

2.2 – Específicos

1. Caracterizar e comparar o perfil de expressão diferencial de miRNAs;
 2. Avaliar os miRNAs como marcadores diagnósticos da síndrome;
 3. Analisar o perfil de expressão dos miRNA em relação a variáveis clínicas (índice de massa corpórea, fenótipos da SOP, hirsutismo e síndrome metabólica) e laboratoriais (hiperandrogenemia, perfil lipídico e glicêmico e resistência à insulina);
 4. Identificar os genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos na SOP por técnicas de bioinformática.
-

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 - Participantes e Local de Estudo

As participantes com SOP foram recrutadas no Setor de Ginecologia Endócrina e Climatério da Divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As participantes do grupo controle foram recrutadas da população em geral por amostragem de conveniência. Todas as participantes receberam orientações sobre a pesquisa conforme a Declaração de Helsinki e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (parecer número 2.622.258) (Anexo B).

Todas as participantes do grupo controle recrutadas eram híginas, apresentavam ciclos menstruais regulares (entre 21 e 35 dias)¹¹ e perfil hormonal dentro dos padrões da normalidade para a faixa etária. Todas as participantes com SOP preencheram os critérios diagnósticos de acordo com o consenso de Rotterdam³⁶ (Tabela 3). Estes critérios diagnósticos foram os escolhidos para a classificação das participantes com SOP, uma vez que tem sido amplamente utilizado em estudos clínicos¹⁴⁹.

Tabela 2 – Critérios Diagnósticos de Síndrome dos Ovários Policísticos de acordo com o Consenso de Rotterdam

Presença de pelo menos dois dos três critérios:		
Oligo/Amenorreia	Sinais Clínicos e/ou Bioquímicos de Hiperandrogenismo	Ovário(s) Policístico(s) ao Ultrassom
Após a exclusão de outras causas de hiperandrogenismo: hiperprolactinemia, tumores ovarianos ou adrenais virilizantes, hiperplasia adrenal congênita de início tardio (HAC), síndrome de Cushing e hipotireoidismo.		

As participantes recrutadas foram entrevistadas e submetidas a exames físico e ginecológico detalhados de acordo com protocolo clínico (Anexo C), na qual foram excluídas a presença de doenças associadas como diabetes mellitus, qualquer tipo de câncer, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, cirrose hepática, doenças da tireoide e doenças autoimunes. Foram excluídas mulheres que apresentaram gestação ou aborto ou foram submetidas a procedimento cirúrgico por um ano antes do estudo. Dentre as medicações de uso regular, foram excluídas mulheres que faziam uso de medicações que alterassem o perfil hormonal e metabólico nos últimos três meses antes do estudo, incluindo contraceptivos hormonais, hipoglicemiantes, estatinas/fibratos e glicocorticoides. Antecedentes ginecológicos e obstétricos bem como história familiar foram coletadas.

Dados colhidos durante o exame físico incluíram peso, altura, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA), circunferência do quadril (CQ), pressão arterial sistêmica, avaliação da presença de acne, alopecia, engrossamento da voz, clitoromegalia e *acantose nigricans*. As medidas da CQ e da CA seguiram as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁸⁹.

As pacientes foram também classificadas de acordo com as categorias de IMC (eutróficas, se $\text{IMC} < 25,0 \text{ Kg/m}^2$; sobrepeso/obesidade, se $\text{IMC} \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$) a que pertenciam, e quanto à presença de síndrome metabólica. Esta foi definida de acordo com os critérios do *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines* (NCEP/ATPIII)¹⁹⁰, o qual requer a presença de três ou mais das seguintes características: $\text{CA} \geq 88\text{cm}$, triglicerídeos $\geq 150 \text{ mg/dL}$, $\text{HDL-C} \leq 50 \text{ mg/dL}$, pressão arterial sistólica $\geq 130 \text{ mmHg}$ e/ou pressão arterial diastólica $\geq 85\text{mmHg}$ e glicemia de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ e/ou glicemia 2 horas após a ingesta de 75 g de glicose $\geq 140\text{mg/dL}$. Presença de dislipidemia e hipertrigliceridemia foram consideradas se concentrações de colesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) $> 160 \text{ mg/dL}$ e/ou $\text{HDL-C} \leq 50 \text{ mg/dL}$; triglicérides $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ¹⁹¹.

A avaliação da presença de hiperandrogenismo clínico (hirsutismo) foi realizada através da escala de Ferriman-Gallwey modificada por Hatch (Figura 6)¹⁹², na qual são avaliadas 9 regiões do corpo quanto à presença e à quantidade de pelos (pontos de 0 a 4 para cada região). Um escore ≥ 8 é considerado positivo para hirsutismo.

Figura 6 – Escala de Ferriman-Gallwey Modificada por Hatch e Colaboradores para Avaliação de Hirsutismo. FONTE: Ferriman et al, 1961⁽¹⁰⁶⁾.

3.2 - Exames Laboratoriais

Amostras de sangue periférico foram coletadas de todas as participantes incluídas após a entrevista médica para avaliação do perfil hormonal e metabólico. Foram obtidas após jejum de 12 horas e durante a fase folicular precoce nas pacientes com ciclos menstruais regulares ou em qualquer fase do ciclo no caso de oligo/amenorreia. Os valores de referência para os parâmetros hormonais e metabólicos foram obtidos através do laboratório central do HC-FMUSP. Os exames laboratoriais e métodos de análise realizados estão descritos no Anexo D. A partir da dosagem dos exames laboratoriais, alguns parâmetros hormonais e metabólicos foram calculados por meio de fórmulas específicas previamente descritas na literatura.

O FAI foi determinado por meio da seguinte fórmula: $\text{testosterona total (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)} \times 100$ ^{193, 194}. A testosterona total foi convertida de ng/dl para nmol/L pela multiplicação por 0,0347.

Para a avaliação do grau de resistência à insulina, foram calculados quatro parâmetros: a) HOMA-IR, determinado pela fórmula: $[\text{glicemia de jejum (mg/dL)} \times 0,05551] \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) / 22,5$ ¹⁰⁸; b) QUICKI, determinado pela fórmula: $1 / (\log \text{insulina } (\mu\text{U/mL}) + \log \text{glicemia (mg/dL)})$ ¹⁰⁹; c) relação glicemia (mg/dl)/insulina $((\mu\text{U/mL})^{106} \text{ (GLI/INS)})$; e d) índice MATSUDA, determinado pela fórmula $10.000 / \sqrt{(\text{glicemia}_0 \times \text{insulina}_0 \times \text{glicemia}_{120} \times \text{insulina}_{120})}$ ¹¹⁰. Foram considerados os seguintes pontos de corte para a presença de resistência à insulina: HOMA-IR > 2,7¹⁹⁵; QUICKI < 0,333¹⁹⁶; relação GLI/INS < 6,4¹⁹⁷ e o índice MATSUDA < 4,75¹⁹⁷.

Outros índices baseados em informações clínicas e laboratoriais, utilizados como indicadores de risco metabólico em algumas populações, foram também calculados para caracterização metabólica adicional da nossa amostra. O Índice de Adiposidade Visceral (VAI) foi calculado através da seguinte fórmula: $VAI = [CA \text{ (cm)} / 36,58 + (1,86 \times IMC \text{ (kg/m}^2\text{)})] \times [Triglicerídeos \text{ (mmol/L)} / 0,81] \times [1,52 / HDL-C \text{ (mmol/L)}]$ ¹⁹⁸. O Produto de Acumulação Lipídica (LAP) foi calculado pela seguinte fórmula: $LAP = [CA \text{ (cm)} - 58] \times Triglicerídeos \text{ (mmol/L)}$ ¹⁹⁹, além da relação triglicerídeos (mg/dL)/HDL-C (mg/dL)²⁰⁰. Os pontos de corte $> 1,675$ para o VAI²⁰¹, $\geq 34,5$ para o LAP²⁰²; e $> 3,0$ para a relação triglicerídeos/ HDL-C²⁰⁰ foram considerados indicativos de maior risco metabólico.

Além disso, as mulheres com SOP foram submetidas a avaliação de curva de glicose e insulina nos tempos 0', 30', 60', 90' e 120' após a ingestão de 75g de glicose, de acordo com os ensaios supracitados para a dosagem destes dois analitos.

3.3- Ultrassonografia Transvaginal

Para avaliação do padrão policístico ovariano, ultrassonografia transvaginal foi realizada nas participantes do grupo SOP. De acordo com o consenso de Rotterdam, os ovários foram considerados como apresentando padrão policístico se preenchessem pelo menos um dos seguintes critérios:

1. Doze ou mais folículos menores do que 10 mm em pelo menos um dos ovários
2. Volume ovariano de, pelos menos um dos ovários, maior do que 10 cm³

3.4– Seleção dos miRNAs do estudo

Foram selecionados 201 miRNAs baseados na literatura como relacionados à SOP, ou à expressão de genes referentes ao metabolismo da insulina, função das células β pancreáticas e diabetes mellitus tipo 2^{173, 185-188} (Tabela 3). A plataforma *FirePlex Discovery Engine* (disponível no site www.fireflybio.com) foi utilizada como auxílio para a seleção.

Tabela 3 – miRNAs Selecionados

Função	miRNAs
Biossíntese, secreção, sensibilidade e resistência à insulina	miR-103a-3p; miR-107; miR-148a-3p; miR-199a-5p; miR-24-3p; miR-26a-5p; miR-26b-5p; miR-miR-30d-5p; miR-96-5d; miR-124-3p; miR-124-5p; miR-200c-3p; miR-200c-5p; miR-375-3p
Alterações glicemia e diabetes do tipo 2	miR-135b-5p; miR-143-3p; miR-335-5p; miR-758-5p; miR-1-3p; miR-124-3p; miR-133a-3p; miR-133-5p; miR-133b; miR-150-5p; miR-152-3p; miR-183-5p; miR-185-5p; miR190a-5p; miR-193a-3p; miR-194-5p; miR195-5p; miR-206; miR-212-3p; miR-214-3p; miR-23a-3p; miR-23b-3p; miR-296-5p; miR-301a-3p; miR-3c-5p; miR-3121-3p; miR-330-5p; miR-34a-5p; miR-361-5p; miR-365a-3p; miR-370-5p; miR-377-3p; miR-380-5p; miR-382-5p; miR-424-5p; miR-433-3p; miR-4458; miR-450a-5p; miR-4699-3p; miR-4729; miR-490-3p; miR-506-3p; miR-452-3p; miR-103a-2-5p; miR-10b-5p; miR-122-3p; miR-122-5p; miR-1249-5p; miR-128-3p; miR-128-2-5p; miR-132-3p; miR-135a-3p; miR-144-5p; miR-145-3p; miR-145-5p; miR-148b-3p; miR-149-3p; miR-153-5p; miR-155-3p; miR-15a-5p; miR16-5p; miR-17-5p; miR-181a-3p; miR-181a-5p; miR-181b-5p; miR-182-3p; miR-187-5p; miR-18a-3p; miR-18a-5p; miR-18b-5p; miR-191-5p; miR-192-3p; miR-192-5p; miR-205-5p; miR-20a-5p; miR-20b-3p; miR-21-3p; miR-215-3p; miR-126a-5p; miR-217-3p; miR-223-3p; miR-223-5p; miR-24-1-5p; miR-24-2-5p; miR-28-3p; miR-29a-5p; miR-302a-5p; miR-30b-5p; miR-320a-3p; miR-342-3p; miR-383-5p; miR-429; miR-455-5p; miR-483-5p; miR-494-3p; miR-494-5p; miR-497-5p; miR-499a-5p; miR-505-3p;

	miR-509-3p; miR-572; miR-574-3p; miR-584-5p; miR-589-3p; miR-592; miR-6069; miR-613; miR-657; miR-660-5p; miR-663a; miR-802; miR-885-5p; miR-95-5p; miR-98-5p; miR-99a-5p; miR-196b-5p; miR-101-3p; miR-101-5p
Disfunção células β SOP e/ou disfunções insulina na SOP	miR-7-5p; miR-184; miR-376a-3p; miR-126-3p Let-7e-5p; miR-155-5p; let-7b-5p; let-7c-5p; let-7d-3p; let-7f-5p; let-7g-5p; let-7i-5p; miR-125a-5p; miR-125b-5p; miR-126-5p; miR-127-3p; miR-129-2-3p; miR-129-5p; miR-130a-3p; miR-130b-3p; miR-146a-5p; miR-16; miR-19a-3p; miR-200a-3p; miR-204-5p; miR-21-5p; miR-27a-3p; miR-27b-3p; miR-29a-3p; miR-29b-3p; miR-29c-3p; miR-320b; miR-324-3p; miR-324-5p; miR-375-5p; miR-381-3p; miR-451a; miR-9-5p; miR-99b-5p; miR-106b-3p; miR-140-5p; miR-141-3p; miR-185-5p; miR-199a-3p; miR-199b-1-5p; miR-19b-3p; miR-222-3p; miR-222-5p; miR-224-5p; miR-301a-3p; miR-301-5p; miR-320a-5p; miR-33a-3p; miR-33a-5p; miR-33b-3p; miR-486-5p; miR-502; miR-6767-5p; miR-92a-3p; miR-92b-3p; miR-93-5p; miR-197-3p; miR-378a-5p; miR-151a-5p; miR-193b; miR-194; miR-122; miR-193b

3.5 - Coleta de Sangue Periférico e Separação do Soro

O sangue periférico foi coletado por venopunção do antebraço e armazenado em tubos BD *Vacutainer*[®] de 5 mL contendo ativador de coágulo em sua parede, o qual acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção do soro com a mais alta qualidade. Após a coleta, os tubos foram homogeneizados manualmente e mantidos em descanso em posição vertical por 30 minutos em temperatura ambiente, para a retenção do coágulo.

Os tubos foram, então, em seguida submetidos à centrifugação a uma velocidade de 2.000 xg, à 4°C por 15 minutos no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular – LIM 58 – da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. O sobrenadante (soro) foi transferido para tubos de 2 mL livres de RNase/DNase e armazenados em alíquotas de 1 mL em freezer -80°C até o momento da extração de RNA. Uma vez que estudo prévio relatou concentrações mais

elevadas de miRNA circulantes no soro em comparação ao plasma, sugerindo que alguns miRNAs possam ser perdidos durante a preparação do plasma, achamos que o uso do soro fosse o mais indicado ²⁰³.

3.6 - Controle de Qualidade das Amostras de Soro - Avaliação da Hemólise por Espectrofotometria

Uma vez que a maioria dos miRNAs encontrados no soro e no plasma estão também presentes nas células do sangue, a hemólise durante a coleta ou processamento da amostra pode afetar o perfil de miRNA a ser investigado²⁰⁴. Devido a isso, todas as amostras de soro das participantes recrutadas foram avaliadas quanto a presença de hemoglobina livre (absorbância A414nm), através do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). Um valor de absorbância $\leq 0,2$ foi considerado adequado para a extração do material genético²⁰⁵.

3.7 - Extração de RNA Total

As amostras foram retiradas do freezer -80°C, descongeladas no gelo e, em seguida, centrifugadas por 5 minutos à 16000 xg à uma temperatura de 4°C, para a remoção de crioprecipitados. Logo após, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL. O processo de extração do RNA total foi, então, iniciado, com o auxílio do kit *miRNeasy Serum/Plasma* (*Qiagen*, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

Um mililitro de *Qiazol Lysis Reagent* foi adicionado aos 200 µL de soro, homogeneizados durante 15 segundos por vórtex e incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C). A fim de monitorar a eficiência da extração de RNA total, foi adicionado, após a incubação, 1,0 µL de uma solução do miRNA-39-3p sintético (*Caenorhabditis elegans* – cel-miR-39-3p; *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) na concentração de 0,02 pmol/µL. Esta concentração foi determinada após testes utilizando várias diluições (de 0,2 a 0,0002 pmol/µL) da solução até que este miRNA amplificasse entre os ciclos ΔCT 24 e 28 da reação de PCR, conforme recomendação do fabricante. Desta forma, este miRNA não compete com a amplificação dos miRNAs selecionados para a análise.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (*Merck*, Alemanha), homogeneizados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente (15-25°C). As amostras foram, então, submetidas à centrifugação sob força de 12.000 xg, à 4°C, durante 15 minutos para a obtenção das fases orgânica (inferior), fase branca (intermediária) e fase aquosa (superior), a qual contém o RNA total. Esta foi transferida para novo microtubo de 2 mL, livre de nucleases e acrescido de um volume de 1,5 x de etanol 100% (*Merck*, Alemanha), para a precipitação do RNA. Após homogeneização por pipetagem, transferiu-se 700 µL da solução para a coluna *RNeasy MinElute Spin* (*Qiagen*, Alemanha), seguida de centrifugação a 8.000 xg, à temperatura ambiente (15-25°C), durante 15 segundos.

Após a centrifugação, prosseguiu-se com as lavagens da coluna com tampões específicos, *RWT* e *RPE*. Por fim, o RNA foi eluído com 14 µL de água livre de nucleases (*Qiagen*, Alemanha), por centrifugação a 8.000 xg por 1 minuto à temperatura ambiente (15-25°C). As amostras de RNA total foram, então, quantificadas por espectrometria ultravioleta (UV) por meio do *Nanodrop 2000*

(*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) e, logo após, foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da sua utilização.

3.8 - Reação de Síntese da Cauda Poly (A)

Uma vez que a concentração de miRNA circulante no soro é baixa, foi utilizado um kit de síntese de cDNA para amostras de pouco rendimento (*Taqman® Advanced miRNA Assays*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). De acordo com protocolo do fabricante, para que se consiga amplificar todos os miRNAs em uma única reação da transcriptase reversa, algumas etapas são necessárias durante a preparação do cDNA. No processo de reação da síntese da cauda poly(A), a *poly(A) polymerase* foi utilizada para adicionar uma cauda 3-adenosina ao miRNA (Figura 7). As amostras de RNA total foram descongeladas. O mix da reação (contendo 0,5 µl de 10x *Poly(A) Buffer*, 0,5 µl de ATP, 0,3 µl *Poly(A) Enzyme*, 1,45 µl água livre de RNases e 0,25 µl de *RNAse out* por amostra) (*Taqman® Advanced miRNA Assays*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) foi preparado em um tubo de 1,5 mL. Em um tubo de 0,2 mL, 3 µl desse mix foi adicionado a 2 µl do RNA total. Após homogeneização, as amostras foram colocadas no termociclador de acordo com o seguinte padrão de ciclagem: Um ciclo a 37°C por 45 minutos e um ciclo a 65°C a 10 minutos.

3.9 – Reação de Ligação do Adaptador

Após a reação da síntese da cauda poly(A), o miRNA foi ligado a um adaptador na extremidade 5' (Figura 7). O adaptador atua como um sítio de ligação do primer

para a reação do miR-Amp. Para esta reação, um mix contendo 3 µl de 5x *DNA Ligase Buffer*, 4,5 µl de 50% *PEG 8000*, 0,6 µl 25x *Ligation Adaptador*, 1,5 µl do *RNA ligase* e 0,4 µl de água livre de RNAses (*Taqman® Advanced miRNA Assays*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) por amostra foi preparado em um tubo de 1,5 mL. Nos tubos com as reações retirados do termociclador, foram transferidos 10 µl do mix em cada amostra. Após homogeneização, os tubos foram novamente colocados no termociclador, seguindo o seguinte padrão de ciclagem: um ciclo a 16^o C a 60 minutos.

3.10 – Reação da Transcrição Reversa (síntese de DNA complementar)

Após a reação de ligação do adaptador, foi iniciada a reação da transcrição reversa. Nessa etapa, um primer RT universal se liga à cauda poly(A) 3', e o miRNA é reversamente transcrito, resultando em um DNA complementar (cDNA) (Figura 7). Para esta reação, um mix contendo 6 µl de 5x *RT Buffer*, 1,2 µl de *dNTP mix* (25mM cada), 1,5 µl 20 x *RT Universal Primer*, 3 µl 10x *RT Enzyme Mix*, 2,05 µl água livre de RNAses e 1,25 *RNAse out* por (*Taqman® Advanced miRNA Assays*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) foi preparado em um tubo de 1,5 mL. Nos tubos de reação retirados do termociclador, foram transferidos 15 µl do mix em cada amostra. Após homogeneização, os tubos foram novamente colocados no termociclador e incubados de acordo com o seguinte padrão de ciclagem: um ciclo a 42^o C por 15 minutos e um ciclo a 85^o C por 5 minutos.

3.11 – Reação do miR-Amp

Após a reação da transcrição reversa, a reação de miR-Amp foi realizada a fim de aumentar o número de moléculas de cDNA (Figura 7). Para esta reação, um mix contendo 25 µl de *2x miR-Amp Master Mix*, 2,5 µl de *20X miR-Amp Primer Mix* e 17,5 µl de água livre de RNase por amostra (*Taqman® Advanced miRNA Assays, Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) foi preparado. 45 µl desse mix foi adicionado em um tubo novo de 0,2 mL. Após, acrescentado 5 µl do produto da reação RT. Após homogeneização, as amostras foram incubadas novamente no termociclador, seguindo o padrão de ciclagem: um ciclo a 95° C por 5 minutos, 14 ciclos a 95° C por 3 segundos, 60° C por 30 segundos e um ciclo a 99° C por 10 minutos.

Figura 7 – Esquema representativo das etapas de conversão seletiva de miRNAs maduros em cDNA utilizando o kit *TaqMan® Advanced miRNAs Assays* (Fonte: *ThermoFisher Scientific*)

3.12 – Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A partir do cDNA sintetizado, deu-se seguimento às reações de PCR em tempo real para teste de amplificação do controle exógeno (*ce-miR-39-3p*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachussetts, EUA). O objetivo desta etapa foi a verificação da qualidade das etapas anteriores (extração de RNA e síntese de cDNA). Para isso, o

esperado foi que ocorresse a amplificação do ce-miR-39-3p em todas as amostras entre os ciclos 24 e 28, conforme a diluição escolhida.

Nesta etapa, o cDNA foi inicialmente diluído em água livre de RNases em uma proporção de 1:9. Em um tubo de 1,5 mL, foi preparado mix contendo 10 µl de *Taqman® Fast Advanced Master Mix (2x)*, 1 µl de *Taqman® Advanced miRNA Assay (20x)* e 4 µl de água livre de RNases por amostra (*Taqman® Advanced miRNA Assays, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*). Após centrifugação, foi adicionado 15 µl do mix e 5 µl do cDNA diluído em cada poço da placa de PCR. As amostras foram analisadas em duplicata, assim como os controles negativos da reação de transcrição e da reação de PCR. A placa foi selada e incubada no aparelho de PCR (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems*) de acordo com o seguinte padrão de ciclagem: um ciclo a 95^o C por 20 segundos e 40 ciclos a 95^o C por 3 segundos e 60^o C por 30 segundos. As amostras cujas amplificações do ce-miR-39-3p não estavam dentro dos ciclos esperados, não preencheram os critérios de qualidade e, portanto, foram excluídas do estudo (2 amostras do grupo SOP e 5 amostras do grupo controle).

3.13 – Técnica qRT-PCR pela Plataforma *Open Array*

A partir do cDNA sintetizado, deu-se seguimento às reações de PCR em tempo real para teste de amplificação dos 201 miRNAs de interesse pela plataforma *Open Array*. Ao todo, 10 chips do *Open Array* foram analisados (10 amostras por chip). Um chip foi excluído das análises finais, pois neste testamos uma diluição diferente das amostras de cDNA, restando 9 chips ao todo. As amostras foram analisadas em duplicata.

Os chips do *Open Array* permitem experimentos de rastreamento de alto rendimento que usam uma pequena quantidade de amostras e reagentes. Cada chip é do tamanho de uma lâmina microscópica e contém 48 sub-matrizes. Cada sub-matriz tem 64 orifícios verdadeiros, totalizando 3.072 orifícios no chip (Figura 8).

Os ensaios são colocados dentro dos orifícios verdadeiros durante o processo de manufaturamento. Cada orifício tem 300µm de diâmetro, 300µm de profundidade e é tratado com um revestimento hidrofílico enquanto que a superfície do chip é tratada com um revestimento hidrofóbico para que 33nL do reagente fique retido em cada orifício por meio de tensão superficial. Antes da preparação dos reagentes, entretanto, é realizado o mapeamento dos ensaios customizados e amostras de cada chip do *Open Array*, utilizando o software *Open Array Sample Tracker*.

Figura 8 - Representação esquemática do chip do *Open Array* (Fonte: *ThermoFisher Scientific*)

Para a preparação das amostras para os chips do *Open Array*, as amostras de cDNA foram misturadas com o *Master Mix*. Nesta etapa, os chips foram retirados do freezer e descongelados em temperatura ambiente por 15 minutos, enquanto o cDNA era preparado. O cDNA foi inicialmente diluído em água livre de RNases em uma proporção de 1:9. Em um tubo de 1,5 mL, 12,5 µL do cDNA diluído foi misturado com 12,5 µL do *Taqman Open Array Real-Time PCR Master Mix*, formando um volume final de reação de 25,0 µL. Como os poços do chip do *Open Array* são muito pequenos, a transferência das reações para o chip ocorre de maneira automatizada. Para isso, as reações foram primeiramente pipetadas em uma placa de 384 poços. A ordem da pipetagem das amostras em seus poços foi designada de acordo com o desenho do chip de *Open Array* pelo software *Open Array Sample Tracker*. Após essa designação, procedeu-se a pipetagem de 5 µL da solução preparada em poço apropriado da placa de 384 poços. Logo após, essa placa foi selada com uma folha de alumínio e centrifugada a uma velocidade de 1.000 rpm por 1 minuto.

A placa de 384 poços contendo as reações foi então colocada no aparelho *AccuFill®* (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA), para que as reações fossem transferidas de maneira automatizada para os chips do *Open Array*. Enquanto isso, as ponteiros foram ajustadas no aparelho, e o chip do *Open Array* foi retirado da embalagem e colocado no aparelho *AccuFill®* para receber as reações da placa de 384 poços. A figura 9 demonstra o aparelho *AccuFill®* com a placa de 384 poços. O alumínio de selagem foi, então, retirado da placa de 384 poços. Os chips de *Open Array* foram também inseridos no aparelho em local apropriado, e procedeu-se a transferência das reações das placas de 384 poços para os chips de *Open Array*.

Figura 9 – Aparelho Accufill® com a placa de 384 poços selada

Logo após receber as amostras, os chips de *Open Array* foram selados com tampa de plástico específica na prensa *QuantStudio 12k Flex Open Array Press 2.0* (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA), e uma solução apropriada foi injetada com uma seringa dentro do estojo formado pelas tampas dos chips selados para que não ocorresse o vazamento do material injetado em cada um de seus poços (Figura 10). A seringa foi então removida e o chip lacrado com um parafuso.

Figura 10 – Injeção da solução preparada com seringa no chip de *Open Array* para que não ocorra o vazamento do material injetado em cada um de seus poços

Os chips foram então inseridos e incubados no aparelho *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) para as reações de RT-PCR de acordo com os seguintes padrões de ciclagem: um ciclo de 20 segundos à 95° C e quarenta ciclos de 3 segundos à 95° C e de 30 segundos à 60° C.

3.14 - Análise dos Resultados da Técnica de qRT-PCR pela Plataforma *Open Array*

Para comparar as diferenças de expressão dos 201 miRNAs selecionados entre os grupos SOP e controle foi realizada análise das corridas e curvas de

amplificação para cada um dos miRNAs em todas as amostras avaliadas, com auxílio do software *ThermoFisher Cloud* (<https://www.thermofisher.com/account-center/cloud-signin-identifier.html>).

A partir dessas curvas foram excluídos os miRNAs que não apresentaram perfil adequado de amplificação de acordo com algoritmo presente no próprio software, conforme indicação do fabricante. Após essa análise, restaram 97 miRNAs. Desses, foram selecionados 3 miRNAs como controles endógenos (let-7b-5p, miR486-5p e miR-92a-3p). Esses miRNAs apresentaram curvas amplificação mais homogêneas em todas amostras, entre todos os miRNAs avaliados, determinadas a partir do resultado do escore de amplificação desses miRNAs ($\leq 1,5$), conforme recomendado pelo fabricante dos reagentes (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). O software considerou a média dos valores dos CT desses três endógenos para os cálculos da expressão relativa (ΔCT) dos demais miRNAs. O ΔCT foi calculado a partir da subtração do CT do grupo SOP ou controle pela média dos CTs dos controles normalizadores (let-7b-5p, miR486-5p e miR-92a-3p)

Para chegar no cálculo do *fold regulation*, foram calculados os valores dos $\Delta\Delta CT$ s e RQ das amostras SOP, utilizando as seguintes fórmulas: $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ do miRNA alvo – ΔCT médio das amostras do grupo controle e $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. A expressão relativa dos miRNAs foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$. O *Fold Regulation* foi calculado utilizando a fórmula: $\log_2 (RQ)$. O valor do *Fold Regulation* representa quantas vezes determinado miRNA é hiperexpresso ou hipoexpresso nas amostras das mulheres com SOP em relação às mulheres controles. Os pontos de corte do *fold regulation* de + 1,0 e -1,0 foram determinados para considerar os miRNAs hiper e hipoexpressos, respectivamente, no grupo SOP. Assim, um *fold regulation* de +1,0 significa que o miRNA foi 1,0 vezes mais expresso na SOP em relação ao grupo

controle, enquanto que um *fold-regulation* de -1,0, significa que este miRNA foi 1,0 vezes menos expresso no grupo SOP. Esse valor de corte foi determinado com o intuito de garantir um número de moléculas suficientes para a validação e, ao mesmo tempo, selecionar aquelas moléculas com maior diferença entre os grupos, aumentando as chances de possuírem um significado biológico significativo na SOP. A partir do *fold-regulation* e das diferenças de expressão relativa entre os grupos SOP *versus* controle foram excluídos 81 miRNAs que não apresentaram diferença de expressão significativa entre os dois grupos. Dos 14 miRNAs restantes, 7 apresentaram amplificação em menos de 80% amostras do estudo e, foram, portanto, excluídos da análise. Assim, os 7 miRNAs restantes prosseguiram para a etapa de validação, na qual foi utilizada uma plataforma para a análise de RT-PCR diferente da de *Open Array*.

3.15– Técnica de qRT-PCR para a Validação dos Resultados

Para a validação dos resultados, foram selecionados os 7 miRNAs que apresentaram as diferenças mais significativas entre os grupos, além de terem amplificado no maior número de amostras.

Nesta etapa, foi utilizado ensaios *Taqman* individuais. O seguinte protocolo foi realizado: o cDNA foi inicialmente diluído em água livre de RNases em uma proporção de 1:9. Em um tubo de 1,5 mL, foi preparado mix contendo 10 µl de *Taqman*[®] *Fast Advanced Master Mix (2x)*, 1 µl *Taqman*[®] *Advanced miRNA Assay (20x)* e 4 µl de água livre de RNases por amostra (*Taqman*[®] *Advanced miRNA Assays*, *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). Após centrifugação, foi adicionado 15 µl do mix e 5 µl do cDNA diluído em cada poço da placa de PCR. As amostras foram

analisadas em duplicata, assim como os controles negativos da reação de transcrição e da reação de PCR. A placa foi selada e incubada no aparelho de PCR (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems*) de acordo com o seguinte padrão de ciclagem: um ciclo a 95^o C por 20 segundos e 40 ciclos a 95^o C por 3 segundos e 60^o C por 30 segundos.

Nessa etapa, os três miRNAs utilizados na etapa anterior como controles normalizadores (*let-7b-5p*, *miR486-5p* e *miR-92a-3p*) foram testados para o mesmo fim. O miRNA que apresentou padrão mais estável e, portanto, que foi utilizado nos cálculos do ΔCT , $\Delta\Delta CT$, RQ e *fold regulation*, foi o *miR-92a-3p*. A seleção do controle normalizador foi baseada na análise dos quatro miRNAs pelo software *NormFinder* (www.moma.dk/normfinder-software)²⁰⁶. Este software considera como gene mais estável entre as amostras aquele(s) com um escore de amplificação <1,0. Escores mais próximos de zero estão relacionados à melhor estabilidade. Os escores de amplificação dos três miRNAs avaliados foram 0,030 para o *let-7b-5p*, 0,087 para o *miR-486-5p* e 0,024 para o *miR-92a-3p*. O *ce-miR-39-3p* também foi testado quanto ao seu padrão de estabilidade, apresentando escore de 0,066. Para os cálculos dos ΔCT s, $\Delta\Delta CT$ s, RQ e *fold-regulation*, foram utilizadas as mesmas fórmulas descritas na etapa anterior (3.14).

3.16 – Avaliação das Redes de Interação entre os miRNAs e seus Principais Alvos Moleculares Envolvidos com o Desenvolvimento de SOP e Disfunções Metabólicas

Cada miRNA pode ter muitos genes alvos, regulando o perfil de expressão desses genes. Para a avaliação das redes de interação dos miRNAs com seus potenciais alvos, foram selecionados os miRNAs que, após validados, mantiveram seu perfil de expressão diferencial significativo entre o grupo SOP e controle. Com o auxílio da plataforma de dados o *miRTargetLink Human*, disponível no site <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>, foram estabelecidas as principais vias de interação desses miRNAs. Posteriormente, dentro desta mesma plataforma, foi realizada análise de enriquecimento dos processos biológicos e funções moleculares em relação à ontologia genética (OG) para a rede de interação dos miRNA diferencialmente expressos.

Além disso, com o intuito de se obter uma lista de vias de sinalização provavelmente controladas por esses miRNAs, foi realizada análise de enriquecimento nos bancos de dados biomédicos: da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG), e das vias Wiki (*Wiki pathways*), buscando vias de sinalização super-representadas na rede de interação desses miRNAs.

3.17 - Análise Estatística

A análise dos dados coletados foi realizada por meio do programa STATA (versão 14.0). Os gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão, mediana (intervalo

interquartil) ou porcentagem, conforme natureza e foram verificados quanto ao padrão de normalidade através de gráficos de distribuição e do teste Shapiro-Wilk. Para a análise de diferença entre dois grupos, o teste T de Student ou o teste de Ranks de Wilcoxon foram utilizados de acordo com a normalidade, para variáveis contínuas. Quando houve a presença de mais de dois grupos, a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para dados normalmente distribuídos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi usado para variáveis não paramétricas, seguidos de análise pós-hoc para múltiplas comparações. Para a análise de variáveis categóricas, o teste qui-quadrado, ou o teste exato de Fisher, quando mais apropriado, foram utilizados. Como esperado, as pacientes controle apresentaram IMC significativamente menor quando comparadas às pacientes com SOP. Devido a isso, o valor de P dos dados laboratoriais foram ajustados por meio de análise de covariância (ANCOVA). Para avaliar o valor diagnóstico dos miRNAs diferencialmente expressos na SOP em relação ao grupo controle, análise de curva ROC foi realizada, com o cálculo da área sob a curva. A construção de curva ROC após análise de regressão logística foi também realizada com o intuito de verificar se os miRNAs diferencialmente expressos na SOP em associação a outro marcador de SOP (o AMH) melhorariam o poder discriminatório do grupo SOP em relação ao grupo controle. O cálculo amostral foi baseado em uma diferença de 50% nas medidas de expressão relativa dos miRNAs entre os grupos SOP e controle, com um desvio padrão comum de 0,5 de acordo com estudo anterior¹⁷⁹. Uma amostra de 17 participantes por grupo apresentou um poder de 80% com um α de 0,05. Com o intuito de se realizar análises exploratórias formando subgrupos dentro do grupo SOP, optou-se por recrutar o dobro de participantes com SOP. Assim, a amostra pretendida para os grupos SOP e controle foram de 40 e 20 participantes, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 - Características Clínicas

Foram recrutadas 58 mulheres, sendo 38 do grupo SOP e 21 do grupo controle. Após análises moleculares, foram excluídas as amostras que apresentaram quantidade de material genético ou qualidade da amplificação no PCR insuficientes, permanecendo 36 mulheres SOP e 16 controles. A análise das características clínicas destas mulheres demonstrou que os dois grupos estão adequadamente pareados quanto à idade ($p = 0,16$) e etnia ($p = 0,87$). Conforme esperado, as participantes com SOP apresentaram maior IMC ($p = 0,03$), CA ($p = 0,001$), CA/CQ ($p = 0,0001$), *acantose nigricans* ($p=0,03$) e escore na escala de Ferriman-Gallwey modificada ($p = 0,0001$) em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Quanto à frequência dos fenótipos nas participantes com SOP, 42,9% pertenciam ao fenótipo A; 22,9% ao fenótipo B; 2,9% ao fenótipo C e 31,4% ao fenótipo D (Gráfico 1). A frequência dos critérios diagnósticos de SOP foram: 97,2% de oligo/amenorreia; 68,7% de hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial e 77,2% de volume ovariano aumentado ou de padrão policístico ao ultrassom. Das participantes que referiram alteração menstrual, 25,7% delas apresentaram amenorreia e 74,3% referiram ciclos oligoamenorreicos. Quanto a história de infertilidade, 47,2% das mulheres com SOP e nenhuma do grupo controle referiram essa queixa. Entretanto, a maioria das participantes do estudo (60%) referiram não ter tido sua fertilidade testada até o momento do

recrutamento. Das mulheres com SOP que referiram infertilidade, o tempo mediano de infertilidade foi de 60 (12-84) meses.

Em relação a história familiar, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na história de diabetes mellitus tipo I ($p = 0,92$), diabetes mellitus tipo II ($p = 0,92$), obesidade ($p = 0,71$) e SOP ($p = 0,62$) entre os grupos SOP e controle (Gráfico 2).

Tabela 4 – Características Clínicas dos Grupos com Síndrome dos Ovários

Policísticos (SOP) vs. Controle

Características Clínicas	SOP (n=36) <i>Média±DP</i>	Controle (n=16) <i>Média±DP</i>	P-valor
Idade (anos)	28,9±4,9	26,8±5,1	0,16
Etnia (%)			0,87**
Branca	37,1	43,8	
Negra	17,1	12,5	
Parda	45,7	43,8	
Tabagismo (%)	2,9	6,3	0,53***
Menarca (anos)	12,3±1,8	12,2±1,4	0,95
IMC (m/kg ²)	32,3±7,6	26,9±8,9	0,03
Circunferência Abdominal (cm)	102,5±17,4	84,3±18,6	0,001
Circunferência do Quadril (cm)	109,1±14,9	102,0±16,0	0,13
Circunferência Abdominal/Quadril	0,94±0,12	0,82±0,06	0,0001*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	113±15	110±15	0,41
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	71±13	69±13	0,44*
Acne (%)	47,2	50,0	0,85**
Acantose Nigricans (%)	38,9	6,3	0,02***
Índice de Ferriman (escore)	7,0 (5-12)	1,5 (0-4)	0,0001*
Ultrassom Transvaginal			
Volume Ovário D (cm ³)	12,0 (9,5-15,4)	-	
Volume Ovário E (cm ³)	11,9(8,0-15,5)	-	
Ovário Policístico (%)	66,7	-	

Dados contínuos reportados como Média±Desvio Padrão ou Mediana (IIQ); dados categóricos reportados como percentagem. Teste T de Student utilizado para análise de variáveis contínuas paramétricas

* Teste de Wilcoxon utilizado para análise de variáveis contínuas não-paramétricas

** Teste Qui-quadrado utilizado para análise de variáveis categóricas

*** Teste Exato de Fisher

Gráfico 1 - Frequência dos Fenótipos no grupo SOP.

Gráfico 2 - Diferenças na história familiar de diabetes, obesidade e SOP entre os grupos SOP versus controle.

4.2 - Características Hormonais

As características hormonais dos dois grupos estão descritas na Tabela 5. Devido à irregularidade menstrual das mulheres com SOP, o tempo mediano da realização da coleta de sangue após o primeiro dia da última menstruação foi de 60 (25-210) dias para mulheres com SOP e 4 (2-6) dias para controles ($p < 0,0001$).

As mulheres com SOP apresentaram maior concentração média de LH ($12,9 \pm 6,4$ IU/L vs $7,0 \pm 5,5$ IU/L $p = 0,001$), relação LH/FSH ($2,47 \pm 0,98$ vs $1,10 \pm 0,89$, $p < 0,0001$), androstenediona ($1,87 \pm 1,11$ ng/mL vs $1,31 \pm 0,39$ ng/mL, $p = 0,04$), testosterona total (53 ± 25 ng/dL vs 34 ± 11 ng/dL, $p = 0,003$) e livre (33 ± 18 pmo/L vs 14 ± 5 , $p < 0,0001$), FAI ($6,02 \pm 4,43$ vs $2,28 \pm 1,23$, $p < 0,0001$) e AMH ($7,48 \pm 4,16$ ng/mL vs $2,89 \pm 2,05$ ng/mL, $p < 0,0001$) em relação às controles, mesmo após ajuste para IMC. Entretanto, as concentrações médias de SHBG foram maiores nas participantes controle em relação às com SOP ($62,4 \pm 29,5$ nmol/L vs $41,8 \pm 24,7$ nmol/L, $p = 0,01$, respectivamente), mantendo uma tendência após ajuste para IMC. Apesar de as concentrações médias de SDHEA estarem maiores no grupo controle em relação ao grupo SOP (2519 ± 958 vs 1865 ± 886 ng/mL, $p = 0,02$), os dois grupos apresentaram concentrações dentro do padrão de normalidade para a faixa etária para este analito. Os demais exames hormonais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 5 - Características Hormonais dos Grupos com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) vs Controle

Exames Hormonais	SOP (n=36) Média±DP	Controle (n=16) Média±DP	P-valor	P-valor**
Tempo DUM (dias)	60 (25-210)	4 (2-6)	<0,0001*	0,02
FSH (IU/L)	5,4±1,9	6,5±1,3	0,04	0,19
LH (IU/L)	12,9±6,4	7,0±5,5	0,0001*	0,001
LH/FSH	2,47±0,98	1,10±0,89	<0,0001*	<0,0001
Prolactina (ng/ml)	13,8±6,5	14,4±6,9	0,64*	0,92
TSH (μIU/mL)	2,52±1,26	2,15±1,36	0,23*	0,45
T4 livre (ng/dL)	1,19±0,17	1,22±0,16	0,53	0,84
SDHEA (ng/mL)	1865±886	2519±958	0,02	0,04
17OHP (ng/mL)	0,80±0,47	0,64±0,34	0,07*	0,36
Androstenediona (ng/mL)	1,87±1,11	1,31±0,39	0,09*	0,04
Testosterona Total (ng/dL)	53±25	34±11	0,003*	0,02
Testosterona Livre (pmol/L)	33±18	14±7	<0,0001*	0,003
SHBG (nmol/L)	41,8±24,7	62,4±29,5	0,01*	0,10
FAI	6,02±4,43	2,28±1,23	0,0001*	0,02
Estradiol (pg/mL)	60,4±38,8	51,7±32,8	0,05*	0,21
AMH (ng/mL)	7,48±4,16	2,89±2,05	<0,0001	<0,0001

DUM: Data da Última Menstruação; FSH: Hormônio Folículo-Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; TSH: Hormônio Tireoestimulante; T4 Livre: Tiroxina Livre; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona; SHBG: Globulina Ligadora dos Hormônios Sexuais; FAI: índice de Androgênio Livre; AMH: hormônio anti-mülleriano

Dados contínuos reportados como Média±DP ou mediana (IIQ)

Teste T de Student utilizado para análise de variáveis contínuas paramétricas

* Teste de Wilcoxon utilizado para análise de variáveis contínuas não-paramétricas

** p-valor ajustado por IMC

Valores de referência: FSH: 3,5-12,5 IU/L; LH: 2,4-12,6 IU/L; Prolactina: 4,2-24,2 ng/mL; TSH: 0,27-4,20 μIU/mL; T4 livre: 0,93-1,70 ng/dL; SDHEA: 988-4070 ng/mL; 17OHP: até 1,1 ng/mL; Androstenediona: até 2,20 ng/mL; Testosterona Total: <49 ng/dL; Testosterona Livre: 2,4-37,0 pmol/L; SHBG: 32,2-128,0 nmol/L; Estradiol: <233,0 pg/mL; AMH: 1,2 a 3,4 ng/mL

4.3 - Características Metabólicas

Quanto à análise do perfil metabólico (Tabela 6), as mulheres com SOP apresentaram maiores concentrações médias de insulina de jejum (29,7±26,4 μU/mL vs 9,5±4,8 μU/mL, p<0,0001), relação glicemia/insulina (5,3±3,7 vs 10,9±5,1, p=0,0001) HOMA-IR (6,9±7,6 vs 2,0±1,1, p = 0,001), VLDL-C (25±12 mg/dL vs 17±6 mg/dL, p = 0,01), triglicerídeos (140±99 mg/dL vs 77±35 mg/dL, p = 0,01), VAI (2,868±2,739 vs 1,256±1,220) e LAP (77,18±55,44

vs $25,63 \pm 27,96$, $p = 0,001$); e menores concentrações médias do QUICKI ($0,31 \pm 0,04$ vs $0,36 \pm 0,03$, $p < 0,0001$) em relação às controles, mesmo após ajuste para IMC, sendo que o HOMA-IR e o VAI mantiveram uma tendência após este ajuste. Embora as participantes com SOP também tenham apresentado maiores concentrações médias de hemoglobina glicada e relação triglicérides/HDL-C, e menores de HDL-C quando comparadas às participantes controle, essas diferenças não persistiram após ajuste pelo IMC. Os demais exames metabólicos não diferiram entre os dois grupos.

Tabela 6 - Características Metabólicas dos Grupos com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) vs. Controle

Perfil Metabólico	SOP (n=36) <i>Média±DP</i>	Controle (n=16) <i>Média±DP</i>	P-valor	P-valor**
Glicemia Jejum (mg/dL)	89,1±12,0	82,5±8,4	0,07*	0,30
Insulina Jejum (μU/mL)	29,7±26,4	9,5±4,8	0,0001*	0,03
Glicemia/Insulina	5,3±3,7	10,9±5,1	0,0001*	0,001
HOMA-IR	6,9±7,6	2,0±1,1	0,0001*	0,10
QUICKI	0,31±0,04	0,36±0,03	<0,0001	0,001
Índice Matsuda	3,32±2,83	-	-	-
Hemoglobina Glicada (%)	5,4±0,5	5,1±0,3	0,01	0,14
25OH-vitamina D (ng/mL)	20,8±5,6	18,4±7,9	0,25	0,03
Proteína C Reativa (mg/L)	4,4±4,6	3,7±6,4	0,25*	0,56
Colesterol Total (mg/dL)	182±39	190±37	0,48	0,48
Colesterol LDL (mg/dL)	104±32	103±35	0,92	0,79
Colesterol HDL (mg/dL)	52±20	65±20	0,004*	0,15
Colesterol VLDL (mg/dL)	25±12	17±6	0,01*	0,04
Triglicerídeos (mg/dL)	140±99	77±35	0,01*	0,046
Triglicerídeos/Colesterol HDL	3,35±3,31	1,58±1,59	0,01*	0,12
VAI	2,868±2,739	1,256±1,220	0,01*	0,09
LAP	72,18±55,44	25,63±27,96	0,001*	0,03
TGO (U/L)	21±12	18±9	0,56*	0,65
TGP (U/L)	21±8	18±5	0,08*	0,15

HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à Insulina; QUICKI: Índice de Checagem Quantitativa de Sensibilidade à Insulina; 25OH-vitaminaD: 25-hidroxvitamina-D; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, VAI: Índice de Adiposidade Visceral; LAP: Produto da Acumulação de lipídeos; TGO: Alanina Aminotransferase, TGP: Aspartato Amino Transferase.

Dados contínuos reportados como Média±DP

Teste T de Student utilizado para análise de variáveis contínuas paramétricas

* Teste de Wilcoxon utilizado para análise de variáveis contínuas não-paramétricas

** p-valor ajustado por IMC

Valores de referência: Glicemia Jejum: 70-99 mg/dL; Insulina Jejum: 2,6-2,4 μU/mL; HOMA-IR: <2,7; Hemoglobina Glicada: 4,1-6,0% 25-OHvitamina D: Proteína C Reativa: <5,0 mg/dL; Colesterol Total: <200 mg/dL; Colesterol LDL: <160 mg/dL; Colesterol HDL: > 60 mg/dL; Colesterol VLDL: <40 mg/dL; Triglicerídeos: <150 mg/dL TGO: <31 U/L TGP: <31 U/L

Além disso, curva glicêmica e insulinêmica foram traçadas nas participantes com SOP. Foram então divididas em três grupos de acordo com os seguintes critérios: SOP sem resistência à insulina ($n=9$) se HOMA-IR $< 2,7$ ¹⁹⁵; SOP com resistência à insulina ($n=25$), se HOMA IR $> 2,7$, SOP com intolerância à glicose ($n=2$) se glicemia 2 horas pós 75g de glicose entre 140-199 mg/dL ¹⁹⁰. Os níveis glicêmicos médios para os três grupos nos tempos 0', 30', 60', 90' e 120' foram $84,1 \pm 3,3$ mg/dL, $120,8 \pm 18,8$ mg/dL, $97,1,9 \pm 12,0$ mg/dL, $86,5,1 \pm 11,9$ mg/dL e $85,4 \pm 17,7$ mg/dL; $93,0 \pm 12,5$ mg/dL, $133,7 \pm 27,7$ mg/dL, $139,7 \pm 33,1$ mg/dL, $121,7 \pm 29,6$ mg/dL e $107,9 \pm 21,3$ mg/dL; e $100,5 \pm 3,5$ mg/dL, $167,5 \pm 14,8$ mg/dL, $197,5 \pm 12,2$ mg/dL, $192,0 \pm 1,4$ mg/dL e $183,0 \pm 1,4$ mg/dL, respectivamente (Gráfico 3). Os níveis insulinêmicos médios para os três grupos nos mesmos tempos supracitados foram $8,5 \pm 2,3$ μ U/mL, $87,7,5 \pm 33,9$ μ U/mL, $85,4 \pm 31,6$ μ U/mL, $54,6 \pm 21,9$ μ U/mL e $66,3 \pm 70,0$ μ U/mL; $31,0 \pm 25,4$ μ U/mL, $207,7 \pm 132,9$ μ U/mL, $262,6 \pm 124,6$ μ U/mL, $215,6 \pm 105,6$ μ U/mL e $165,3 \pm 167,6$ μ U/mL; e $44,8$ μ U/mL, $194,6$ μ U/mL $278,6$ μ U/mL $260,6$ μ U/mL e $336,2$ μ U/mL, respectivamente (Gráfico 3). Apenas uma participante do grupo com intolerância à glicose teve suas concentrações de insulina estabelecidas, devido ao grau de hemólise inadequado de uma das amostras para a determinação da insulina. Agrupando as participantes com SOP entre resistentes e não resistentes à insulina de acordo com os valores de HOMA-IR, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos valores médios de glicemia de jejum ($p=0,01$) e glicemia duas horas pós 75g de glicose ($p=0,01$), insulina de jejum ($p=0,0001$) e insulina duas horas após 75g de glicose ($p=0,001$).

Gráfico 3 - Diferenças nas curvas de insulinemia e glicemia entre os grupos SOP sem e com resistência à insulina e com intolerância à glicose. Dosagens das concentrações de insulina e glicose foram realizadas nos tempos 0', 30', 60', 90' e 120' após ingesta de 75g de glicose. Critério utilizado para resistência à insulina: HOMA-IR > 2,7. Critério utilizado para intolerância à glicose: Glicemia 2 horas após ingesta de 75 g de glicose entre 140 e 199 mg/dL.

As participantes, também, foram categorizadas de acordo com o grau de resistência à insulina e intolerância à glicose por meio de diferentes critérios, já descritos na literatura e previamente detalhados na sessão dos métodos deste estudo. De acordo com os parâmetros utilizados, a frequência de resistência à insulina variou de 69,4% a 75,0% entre as mulheres com SOP e de 18,8% a 31,3% nas controles. Essas diferenças entre o grupo SOP e controle foram estatisticamente significativas (Gráfico 4). Em relação à frequência de intolerância à glicose, esta variou de 6,5% a 22,9% nas participantes com SOP, dependendo do critério utilizado. Nenhuma participante controle apresentou intolerância à glicose (Gráfico 4). As participantes controles não foram submetidas ao teste de tolerância à glicose e, por isso, não há dados do grau de resistência à insulina pelo índice MATSUDA, nem da frequência de intolerância à glicose pelo teste de tolerância neste grupo.

Gráfico 4 - Diferenças na frequência de resistência à insulina e intolerância à glicose entre os grupos SOP e controle. Critérios utilizados para resistência à insulina: HOMA-IR $>2,7$; QUICKI $<0,333$; GLI/INS $<6,4$; MATSUDA $<4,75$. Critérios utilizados para intolerância à glicose: HbA1c entre 5,7 e 6,4%; glicemia de jejum entre 100 e 127 mg/dL; TOTG 2hs pós 75g entre 140 e 199 mg/dL.

Quanto ao perfil lipídico, as participantes foram classificadas de acordo com o grau de dislipidemia e hipertrigliceridemia também usando como referência critérios descritos previamente na literatura¹⁹⁰. A frequência de dislipidemia foi de 47,2% nas mulheres com SOP e de 18,6% nas mulheres controles ($p = 0,07$). A frequência de hipertrigliceridemia foi de 33,3% nas participantes com SOP e de 6,3% nas participantes controle ($p = 0,04$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Diferenças na frequência de dislipidemia e hipertrigliceridemia entre os grupos SOP e controle. Dislipidemia definida como: HDL-C < 50mg/dL e/ou LDL-C > 160mg/dL. Hipertrigliceridemia definida como: Triglicerídeos $\geq$ 150mg/dL.

As participantes também foram classificadas quanto à presença de síndrome metabólica, e a frequência dos critérios desta síndrome nos dois grupos foi determinada (Gráfico 6). As prevalências da síndrome metabólica no grupo SOP e controle foram 27,9% e 12,5%, respectivamente. Os critérios da síndrome mais prevalentes na nossa população foram, em ordem decrescente, aumento da circunferência abdominal, dislipidemia, hipertrigliceridemia, alteração da glicemia e hipertensão (Gráfico 7).

Gráfico 6 – Diferenças nas frequências de síndrome metabólica entre os grupos SOP e controle.

Gráfico 7 – Diferenças nas frequências dos critérios para diagnóstico de síndrome metabólica entre os grupos SOP e controle. Pontos de corte utilizados baseado nos critérios NCEP/ATPIII¹⁹⁰.

A relação entre as concentrações séricas de insulina e o número de componentes da síndrome metabólica foi avaliada. O gráfico 8 demonstra que quanto maior as concentrações séricas de insulina maior o número de

componentes da síndrome metabólica na nossa população, sugerindo uma relação direta entre a hiperinsulinemia e o aumento do risco metabólico.

Gráfico 8 – Diferenças nos valores medianos de insulinemia baseado na quantidade de componentes da síndrome metabólica existentes.

Além disso, as participantes foram classificadas como apresentando menor ou maior risco metabólico de acordo com outros parâmetros clínicos utilizados na literatura, como a presença de relação triglicérido/ HDL-C $> 3,0^{200}$, de VAI $> 1,675^{201}$ e de LAP $> 34,5^{202}$. A frequência de aumento do risco metabólico variou de 36,1% a 77,9% nas mulheres com SOP e de 6,0% a 25,0% nas mulheres controles, com a utilização desses parâmetros (Gráfico 9). Todas essas diferenças entre SOP e controles foram estatisticamente significativas.

Gráfico 9 - Diferenças de frequência de maior risco metabólico entre os grupos SOP e controles, classificadas utilizando critérios distintos para avaliação do risco metabólico. Pontos de corte para Triglicerídeos/C-HDL > 3,0, para VAI > 1.675; e para LAP > 34,5.

4.4– Análise de Expressão dos miRNAs

Ao todo, 201 miRNAs foram analisados pela a plataforma de *Open Array*. Destes, 103 apresentaram dados de expressão insuficientes para a realização de qualquer análise, e 3 foram selecionados como controles endógenos (let-7b-5p, miR-486-5p e miR92a-5p), devido ao seu padrão de estabilidade adequado em todas as amostras, restando 95 miRNAs para a análise diferencial entre os dois grupos. (Algoritmo 1).

Algoritmo 1 – Algoritmo esquemático demonstrando os miRNAs selecionados para estudo (n=201), miRNAs escolhidos como controles endógenos (n=3), miRNAs insuficientes para as análises (n=103) e miRNAs que prosseguiram para a análise estatística (n=95).

Para a determinação da expressão diferencial desses 95 miRNAs do grupo SOP em relação ao controle, o *fold-regulation* foi, então, determinado, conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 - Fold Regulation (FR) dos miRNAs Avaliados no Grupo com SOP em

Relação ao Grupo Controle

miRNA	Fold Regulation (n)	miRNA	Fold Regulation (n)	miRNA	Fold Regulation (n)
Let-7e-5p	-1,593 (8)	miR-26a-5p	1,091 (36)	miR-151a-5p	-0,452 (33)
miR-143-3p	-0,826 (19)	miR-26b-5p	0,214 (35)	miR-15a-5p	-0,466 (36)
miR-335-5p	0,655 (12)	miR-27a-3p	0,605± (34)	miR-16-5p	0,479 (36)
Let-7a-5p	0,418 (30)	miR-27b-3p	-0,534 (30)	miR-17-5p	0,208 (35)
Let-7c-5p	0,943 (7)	miR-296-5p	-0,483 (15)	miR-181a-5p	-0,635 (36)
Let-7d-3p	-1,345 (12)	miR-29a-3p	0,240 (35)	miR-181b-5p	-1,601 (32)
Let-7f-5p	0,689 (30)	miR-29b-3p	-0,684 (31)	miR-18a-3p	-1,585 (19)
Let-7g-5p	0,445 (36)	miR-29c-3p	-2,006 (9)	miR-18a-5p	-0,093 (33)
Let-7i-5p	-0,485 (36)	miR-301a-3p	-1,653 (18)	miR-191-5p	0,267 (36)
miR-103a-3p	-1,062 (34)	miR-30c-5p	0,036 (31)	miR-192-5p	-1,364 (15)
miR-107	-0,561 (36)	miR-30d-5p	-0,005 (36)	miR-197-3p	1,979 (11)
miR-125a-5p	-0,711 (35)	miR-320b	-0,394 (21)	miR-199a-3p	-1,488 (20)
miR-125b-5p	-0,909 (36)	miR-324-3p	4,378 (11)	miR-19b-3p	-1,717 (33)
miR-126-5p	-0,002 (34)	miR-324-5p	-0,552 (10)	miR-20a-5p	0,152 (36)
miR-127-3p	-2,503 (13)	miR-361-5p	-1,634 (31)	miR-21-3p	-1,404 (10)
miR-130a-3p	-0,825 (30)	miR-376a-3p	-1,200 (36)	miR-222-3p	-1,241 (35)
miR-130b-3p	-0,602 (11)	miR-382-5p	-2,257 (13)	miR-223-3p	0,323 (36)
miR-133a-3p	-0,995 (30)	miR-424-5p	-0,751 (29)	miR-28-3p	-1,232 (26)
miR-146a-5p	-0,590 (36)	miR-433-3p	-2,061 (14)	miR-30b-5p	0,228 (23)
miR-148a-3p	-0,708 (33)	miR-451a	-0,967 (36)	miR-320a-3p	-0,300 (35)
miR-150-5p	-0,565 (36)	miR-7-5p	0,311 (20)	miR-33a-5p	-1,622 (17)
miR-15b-5p	0,639 (6)	miR-99b-5p	-0,928 (23)	miR-342-3p	-0,735 (36)
miR-185-5p	0,869 (36)	miR-103a-25p	0,056 (17)	miR-483-5p	-1,575 (7)
miR-190a-5p	0,155 (12)	miR-106b-3p	-0,902 (28)	miR-494-3p	-3,977 (13)
miR-194-5p	-0,717 (23)	miR-10b-5p	-0,545 (24)	miR-505-3p	-2,357 (26)
miR-195-5p	-1,055 (12)	miR-122-5p	-0,854 (35)	miR-584-5p	-1,136 (11)
miR-199a-5p	-1,488 (20)	miR-126-3p	0,017 (35)	miR-660-5p	-3,002 (22)
miR-19a-3p	0,367 (34)	miR-128-3p	-1,982 (29)	miR-885-5p	-2,020 (22)
miR-21-5p	1,098 (36)	miR-132-3p	-0,874 (9)	miR-92b-3p	0,376 (36)
miR-23a-3p	-1,506 (36)	miR-144-5p	-2,865 (4)	miR-93-5p	-0,027 (35)
miR-23b-3p	-0,796 (24)	miR-145-5p	-0,126 (33)	miR-101-3p	-0,294 (22)
miR-24-3p	-0,024 (36)	miR-148b-3p	-0,244 (31)		

Dados representados como média das amostras (SOP) em que houve expressão.

Valor de corte do *fold regulation* foi estabelecido em >1 para hiperexpressão (vermelho) e <1 para hipoexpressão (azul)

Destes miRNAs 95, apenas 33 apresentaram expressão diferencial (4 hiperexpressos e 29 hipoexpressos) no grupo SOP em relação aos controles.

Para estes, as diferenças médias de expressão relativa foram analisadas entre os dois grupos, a fim de verificar a relevância estatística dos achados entre os dois grupos (Tabela 8).

Tabela 8 - Expressão Relativa dos miRNAs entre Amostras dos Grupos SOP vs Controle

miRNA	SOP	Controle	Valor P
	<i>Média±DP (n)</i>	<i>Média±DP (n)</i>	
Let-7e-5p	0,031±0,016 (9)	0,065±0,24 (3)	0,03*
Let-7d-3p	0,353±0,258 (12)	0,477±0,187 (3)	0,56*
miR-103a-3p	0,021±0,016 (34)	0,033±0,016 (13)	0,01*
miR127-3p	0,005±0,004 (13)	0,015±0,013 (4)	0,05*
miR-199a-5p	0,028±0,030 (20)	0,065±0,053 (4)	0,22*
miR-21-5p	0,128±0,080 (36)	0,085±0,070 (16)	0,04
miR-23a-3p	0,166±0,171 (36)	0,041±0,254 (16)	0,0001*
miR-26a-5p	0,692±0,465 (36)	0,396±0,250 (16)	0,02
miR-29c-3p	0,101±0,095 (9)	0,224±0,066 (2)	0,09*
miR-301a-3p	0,007±0,008 (18)	0,013±0,005 (3)	0,16*
miR-324-3p	0,017±0,027 (11)	0,0002 (1)	0,19*
miR-361-5p	0,010±0,009 (31)	0,020±0,012 (7)	0,02*
miR-376a-3p	0,008±0,009 (36)	0,015±0,006 (14)	0,0004*
miR-382-5p	0,003±0,003 (13)	0,015±0,011 (4)	0,02*
miR-433-3p	0,016±0,013 (14)	0,052±0,049 (4)	0,06*
miR-128-3p	0,002±0,002 (29)	0,008±0,005 (5)	0,003*
miR-144-5p	0,041±0,070 (4)	0,124±0,093 (7)	0,06*
miR-181b-5p	0,014±0,021 (32)	0,043±0,051(9)	0,04*
miR-18a-3p	0,006±0,015 (18)	0,008±0,0002 (2)	0,08*
miR-192-5p	0,200±0,226 (15)	0,335±0,149 (3)	0,21*
miR-197-3p	13,237±10,303 (11)	2,677±1,564 (6)	0,02*
miR-199a-3p	0,279±0,030 (20)	0,065±0,053 (4)	0,22*
miR-19b-3p	0,186±0,171 (34)	1,088±1,046 (8)	0,0001*
miR-21-3p	0,016±0,008 (10)	0,038 (1)	0,11*
miR-222-3p	0,010±0,010 (35)	0,018±0,011 (15)	0,003*
miR-28-3p	0,013±0,013 (26)	0,020±0,015 (7)	0,12*
miR-33a-5p	0,027±0,022 (17)	0,066±0,027 (3)	0,04*
miR-483-5p	0,021±0,018 (7)	0,022 (1)	0,83*
miR-494-3p	0,004±0,005 (13)	0,048 (1)	0,11*
miR-505-3p	0,007±0,009 (26)	0,012±0,006 (4)	0,10*
miR-584-5p	1,482±1,324 (11)	0,978±0,458 (4)	0,79*
miR-660-5p	0,008±0,019 (22)	0,011±0,004 (2)	0,14*
miR-885-5p	0,009±0,010 (22)	0,023±0,012 (3)	0,05*
Expressão relativa ($2^{-\Delta CT}$)			
Dados reportados como Média±DP			
Teste T de Student utilizado para análise de variáveis contínuas paramétricas			
* Teste de Wilcoxon utilizado para análise de variáveis contínuas não-paramétricas			

Após essas análises, verificou-se que as diferenças de expressão entre 19 desses miRNAs não foram estatisticamente significativas. Em relação aos 14 miRNAs restantes, foi analisado o número de amostras em que houve

amplificação. Optou-se, então, por excluir da etapa de validação aqueles miRNAs que apresentaram amplificação em menos de 80% das amostras do estudo, restando 7 miRNAs (miR-103a-3p, miR-21-5p; miR-23a-3p, miR-26a-5p, miR-376a-3p, miR-19b-3p e miR-222-3p). Esses miRNAs foram, então, selecionados para a etapa de validação por meio de ensaios *Taqman* individuais. Seus *fold-regulation* foram determinados e comparados com os encontrados pela plataforma *Open Array* (Tabela 9). Observou-se, então, que apenas os miRNAs miR-26a-5p e miR-21-5p mantiveram consistência nos seus resultados de expressão (hiperexpressão) diferencial nas participantes com SOP em relação aos controles nas duas técnicas utilizadas.

Tabela 9 – Validação do Perfil de Expressão dos miRNAs Avaliados no Grupo SOP em Relação ao Grupo Controle Utilizando Duas Técnicas

miRNA	Fold Regulation (n)	Fold Regulation (n)
	<i>Open Array</i>	<i>Ensaaios Taqman Individuais</i>
miR26a-5p	1,091 (36)	0,762 (36)
miR103a-3p	-1,062 (34)	1,509 (36)
mir19b-3p	-1,717 (33)	1,287 (36)
miR376a-3p	-1,200 (36)	0,963 (36)
mir222-3p	-1,241 (35)	0,128 (36)
miR21-5p	1,098 (36)	1,302 (36)
miR23a-3p	-1,506 (36)	0,451 (36)
Dados representados como média de amostras (SOP) em que houve expressão.		
Valor de corte foi estabelecido em >1 para hiperexpressão (vermelho) e <1 para hipoexpressão (azul)		

As diferenças de expressão relativa desses dois miRNAs entre os grupos SOP e controle foram avaliadas. Apenas o miR-21-5p apresentou diferença significativa entre os dois grupos (Gráfico 10). Este miRNA, portanto, foi selecionado para prosseguir com as análises de discriminação entre os dois grupos, bem como de associação com as diferentes características clínicas encontradas na SOP.

Gráfico 10 - Diferenças de expressão relativa do miR-26a-5p e miR-21-5p entre os grupos SOP e controle. Gráficos representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

4.5- Análises de Curvas ROC para a Discriminação do Grupo SOP em Relação ao Grupo Controle

Para avaliar se a utilização das concentrações séricas do miR-21-5p apresenta potencial como biomarcador de SOP, análise de curva ROC foi realizada, utilizando dados de sua expressão relativa, para determinar se este miRNA é capaz de discriminar mulheres com SOP de controles saudáveis. Além disso, considerando o papel que o AMH vem apresentando como um potencial biomarcador de SOP, a análise comparativa entre as curvas ROC deste hormônio e a do miR-21-5p também foi efetuada. Com isso, procurou-se avaliar se as concentrações séricas deste miRNA apresenta potencial superior ou semelhante às do AMH para diferenciar mulheres com SOP de controles saudáveis.

A área sob a curva (AUC) para o miR-21-5p foi de 0,81 [95% IC 0,69-0,93], enquanto que para o AMH foi de 0,85 [95% IC 0,75-0,96]. Logo, na população

deste estudo, a dosagem sérica do miR-21-5p apresentou 81% de chance de identificar corretamente uma mulher com SOP, enquanto a do AMH foi de 85%. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,57$) (Gráfico 11).

O valor da expressão relativa de maior especificidade para o diagnóstico de SOP, para a curva do miR-21-5p foi o de 0,145 [sensibilidade de 58,3% e especificidade de 100%], enquanto o valor de maior sensibilidade e especificidade combinadas foi o de 0,856 [sensibilidade de 75,0% e especificidade de 62,5%]. Para a curva de AMH, a concentração de maior especificidade para o diagnóstico de SOP foi o de 7,67 ng/mL [sensibilidade de 51,4% e especificidade de 100%], enquanto a de maior sensibilidade e especificidade combinadas foi de 3,70 ng/mL [sensibilidade de 80,0% e especificidade de 81,3%].

Gráfico 11 – Comparação entre as curvas ROC do miR-21-5p e do AMH para a discriminação dos grupos SOP e controle.

Uma vez que ambas moléculas demonstraram potencial relevante e semelhante de discriminar mulheres com SOP, foi realizada a combinação de suas curvas, por meio de regressão logística, para avaliar se a determinação do miR-21-5p e do AMH em conjunto apresenta melhor chance de identificação dessas mulheres. Neste caso, a área sob a curva foi de 0,92 [95% IC 0,73-0,94], ou seja, ao combinar a análise dessas duas moléculas, a chance de identificar mulheres com SOP aumentou para 92%, tornando esta combinação mais eficiente como marcadora da síndrome (Gráfico 12). A sensibilidade desta combinação foi de 91,4% e a especificidade de 87,5%, com valores preditivos positivo e negativo de 94,1% e 82,4%, respectivamente.

Gráfico 12 – Curva ROC demonstrando a combinação do miR-21-5p e do AMH para a discriminação dos grupos SOP e controles.

4.6 – Expressão do miR-21-5p em Função das Características Clínicas das Participantes

4.6.1 – Sobrepeso/Obesidade

Uma vez que os grupos SOP e controle diferiram quanto ao valor médio de IMC, análise de subgrupo foi realizada dividindo-os de acordo com os valores de IMC (ponto de corte de 25 kg/m²). Observou-se que as diferenças médias na expressão relativa do miR-21-5p se manteve entre SOP e controles eutróficas ($0,574 \pm 0,664$ vs $0,072 \pm 0,051$, $p=0,01$) e com sobrepeso/obesidade ($0,254 \pm 0,318$ vs $0,067 \pm 0,044$, $p=0,02$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos com SOP ($p=0,12$) (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Expressão do miR-21-5p em subgrupos de mulheres com SOP e controle de acordo com o IMC. Grupo SOP eutrófica (n=7), controle eutrófica (n=9), SOP sobrepeso/obesidade (n=29), controle sobrepeso/obesidade (n=7). Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

4.6.2 - Hiperandrogenismo e Resistência à Insulina

Análises de subgrupos foram feitas para avaliar diferenças na expressão do miR-21-5p de acordo com a presença ou ausência de hirsutismo, hiperandrogenemia e de resistência à insulina. Além disso, como as concentrações de SHBG estão relacionadas a essas duas últimas características, a expressão diferencial deste miRNA de acordo com esta globulina foi também determinada. Em relação ao grupo controle, o grupo SOP com hirsutismo apresentou hiperexpressão do miR-21-5p ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,387 \pm 0,518$, respectivamente, $p=0,03$), enquanto não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e SOP sem hirsutismo ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,255 \pm 0,280$, $p=0,35$) e entre os dois grupos SOP ($p=0,80$). Quanto a presença de hiperandrogenemia, os resultados foram semelhantes. Em relação ao grupo controle, o grupo SOP com hiperandrogenemia apresentou hiperexpressão do miR-21-5p ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,432 \pm 0,581$, respectivamente, $p=0,02$), enquanto não houve diferenças entre os grupos controle e SOP sem hiperandrogenemia ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,250 \pm 0,264$, $p=0,33$) e entre os dois grupos SOP ($p=0,38$). Esses dados estão demonstrados no gráfico 14.

Gráfico 14 – Expressão do miR-21-5p em subgrupos com SOP e controle de acordo com os seguintes critérios: hirsutismo (HI) se escore de Ferriman-Gallwey ≥ 8 , e hiperandrogenemia (HA) se testosterona livre $\geq 37,0$ pmol/L. Grupo controle (n=16), grupo SOP sem hirsutismo (n=19), grupo SOP com hirsutismo (n=17), grupo SOP sem HA (n=23) grupo SOP com HA (n=13). Dados representados como mediana (IQQ) e 1 a 99 percentis.

Em relação à presença ou ausência de resistência à insulina, os grupos SOP e controle foram subdivididos, utilizando o ponto de corte de 2,7 para o HOMA-IR¹⁹⁵. Houve diferença na expressão do miR-21-5p entre os grupos SOP e controle sem resistência à insulina ($0,392 \pm 0,222$ vs $0,063 \pm 0,046$, respectivamente, $p=0,001$), porém essa diferença não foi encontrada entre os grupos resistentes à insulina ($0,321 \pm 0,458$ vs $0,100 \pm 0,046$, $p=0,39$), bem como entre os dois grupos SOP ($p=0,25$).

Referente às análises quanto às concentrações de SHBG, foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão do miR-21-5p entre os grupos controle e SOP com diminuição da concentração de SHBG ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,414 \pm 0,555$, $p<0,05$). As comparações entre controle e SOP com concentrações normais de SHBG ($0,028 \pm 0,190$) e entre os dois grupos SOP,

não mostraram diferenças estatísticas ($p=0,52$ e $0,31$, respectivamente). Todas essas análises estão representadas no gráfico 15.

Gráfico 15 – Expressão do miR-21-5p em subgrupos de mulheres com SOP e controle de acordo com os seguintes critérios: resistência à insulina (RI), se HOMA-IR > 2,7; SHBG diminuído (SHBG D) se SHBG sérico >32,2 nmol/L. Grupos controle sem RI (n=13), controle com RI (n=3), SOP sem RI (n=9), SOP com RI (n=27). Grupos controle (n=17), SOP com SHBG normal (SHBG N) (n=19), SOP com SHBG D (n=17). Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

4.6.3 - Fenótipos da SOP

Análise de subgrupo também foi realizada para determinar se a expressão do miR-21-5p ocorre de maneira diferente entre os diversos fenótipos da SOP. Como os fenótipos A e B geralmente apresentam comportamento similar, sendo os fenótipos clássicos e mais severos da síndrome, ou seja, a prevalência de resistência à insulina e outra disfunção metabólica está presente em torno de 75-85% nesses casos, e o fenótipo D sendo considerado o mais brando (ausência de hiperandrogenismo e menor chance de disfunção metabólica)⁷, dois subgrupos foram divididos com o intuito de separar os fenótipos mais clássicos

(A e B) do fenótipo mais brando (D). Devido à baixa prevalência do fenótipo C na nossa população (fenótipo intermediário) e à presença de características similares aos primeiros fenótipos (como hiperandrogenismo), as participantes com este fenótipo foram agrupadas juntos ao primeiro grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão diferencial do miR-21-5p entre os fenótipos A-C vs D na nossa população ($0,312 \pm 0,449$ vs $0,339 \pm 0,345$, $p=0,41$) (Gráfico 16).

Gráfico 16- Expressão do miR-21-5p entre os fenótipos A-C (n=24) vs D (n=11) da SOP. Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

4.6.4 - Critérios de Risco Metabólico

Com o intuito de avaliar se a expressão do miR-21-5p está relacionada com o aumento do risco metabólico na SOP, análises exploratórias de subgrupo também foram realizadas de acordo com os diferentes critérios de aumento do risco metabólico encontrados na literatura.

Primeiro, as mulheres com SOP foram classificadas de acordo com a presença ou não de síndrome metabólica e comparadas entre si e com as

mulheres controles. Foi encontrada uma hiperexpressão do miR-21-5p em mulheres SOP sem síndrome metabólica em relação às mulheres controles ($0,355 \pm 0,433$ vs $0,070 \pm 0,047$, respectivamente, $p=0,002$). Entretanto, não houve diferença significativa na expressão deste miRNA entre controles e SOP com síndrome metabólica ($0,070 \pm 0,047$ vs $0,215 \pm 0,399$, $p=0,95$) nem entre os dois grupos com SOP ($p=0,86$) (Gráfico 17).

Gráfico 17- Expressão do miR-21-5p entre mulheres controles (n=16) e mulheres SOP sem (n=26) e com (n=10) síndrome metabólica. Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

Posteriormente, as participantes foram subdivididas de acordo com os outros critérios de risco metabólico encontrados na literatura prévia²⁰⁰⁻²⁰². De acordo com o critério TGL/HDL-C, foi encontrada hiperexpressão do miR-21-5p no grupo SOP com esta relação aumentada quando comparadas ao grupo controle ($0,406 \pm 0,614$ vs $0,070 \pm 0,047$, respectivamente, $p=0,002$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e SOP com a relação TGL/HDL-C normal ($0,070 \pm 0,0047$ vs $0,260 \pm 0,227$, $p=0,27$) nem entre os grupos SOP ($p=0,66$) (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Expressão do miR-21-5p nos grupos SOP e controle de acordo com a relação Triglicerídeos/C-HDL. Pontos de corte para Triglicerídeos/C-HDL (TGL/HDL-C) > 3,0. Grupos controle (n=16), SOP TGL/HDL normal (n=24) e SOP TGL/HDL > 3 (n=13). Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

Utilizando o critério do índice VAI, foi encontrada hiperexpressão do miR-21-5p entre os grupos SOP e controle com o índice VAI dentro da normalidade ($0,264 \pm 0,201$ vs $0,063 \pm 0,041$, $p=0,001$). Essa mesma diferença não foi encontrada entre o grupo SOP e controle com o índice VAI aumentado ($0,349 \pm 0,501$ vs $0,099 \pm 0,068$, $p=0,28$). Não houve, também, diferenças significativas entre os dois grupos de mulheres com SOP ($p=0,46$).

Por fim, a mesma análise foi realizada utilizando o índice LAP. De acordo com esse critério, foi encontrada hiperexpressão do miR-21-5p entre os grupos SOP e controle com esse índice dentro na normalidade ($0,321 \pm 0,229$ vs $0,068 \pm 0,004$, $p=0,002$). Esta mesma diferença não foi encontrada entre mulheres SOP e controle com o índice LAP aumentado ($0,314 \pm 0,451$ vs $0,075 \pm 0,59$, $p=0,09$). Não foi encontrada, também diferenças significativas entre

os dois grupos de mulheres com SOP ($p=0,21$). Todas essas análises estão representadas no gráfico 19.

Gráfico 19 - Expressão do miR-21-5p nos grupos SOP e controle classificadas utilizando critérios distintos para avaliação do risco metabólico. Pontos de corte para $VAI > 1,675$; e para $LAP \geq 34,5$. Grupos controle $VAI \leq 1,675$ ($n=13$), SOP $VAI \leq 1,675$ ($n=14$), controle $VAI > 1,675$ ($n=3$) e SOP $VAI > 1,675$ ($n=22$). Grupos controle $LAP < 34,5$ ($n=12$) SOP $LAP < 34,5$ ($n=8$), controle $LAP \geq 34,5$ ($n=4$) e SOP $LAP \geq 34,5$ ($n=28$). Dados representados como mediana (IQQ) e percentis 1 a 99.

4.7 - Redes de Interação e Análise de Enriquecimento entre o miR-21-5p e seus Principais Alvos Moleculares Envolvidos com o Desenvolvimento de SOP e suas Disfunções Metabólicas

Um único miRNA pode regular a expressão de vários genes alvos por meio do pareamento com seus RNAs mensageiros específicos. Para melhor entender o papel do miR-21-5p na fisiopatologia da SOP, suas redes de interação foram avaliadas por meio da plataforma *miRTargetLink Human* (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>). Apenas interações com forte sustentação na literatura foram incluídas, totalizando 99 genes alvos (Figura 11).

Posteriormente, análise de enriquecimento dos processos biológicos e das funções moleculares em relação à ontologia genética (OG) desses miRNAs foi realizada. Na tabela 10, está representada uma seleção dos principais processos biológicos e funções moleculares dos genes, relacionados ao miR-21-5p, que podem estar implicados na fisiopatologia da SOP e suas disfunções.

Com o intuito de se obter uma lista de vias de sinalização provavelmente controladas por este miRNA, esta mesma plataforma, *miRTargetLink Human*, faz uma busca nos bancos de dados biomédicos: da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG) e das vias Wiki (*Wiki pathways*). A seleção das principais vias de interação que estavam super representadas e que podem estar relacionadas com a fisiopatologia da SOP estão listadas na tabela 11. A descrição completa tanto das análises de OG e quanto das vias de sinalização encontra-se no Anexo E.

Figura 11 – Redes de interação do miR-21-5p com seus 99 alvos moleculares. Adaptado: *miRTargetLink Human* (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>).

Tabela 10- Verificações por ontologia genética (GO) dos processos biológicos e funções moleculares associadas com os genes alvo do miR-21-5p. Os processos biológicos e funções moleculares descritos foram selecionados por representarem funções que podem estar relacionadas à fisiopatologia da SOP

Processos Biológicos	Número de Genes	Genes Alvo	P-valor
Morfogênese Glandular	10	<i>BCL2, EGFR, ERBB2, IGF1R, NCOA3, NFIB, SERPINB5, TGFB2, TNFAIP3, TP63</i>	0,00004
Diferenciação de Células Tronco	12	<i>BCL2, JAG1, MEF2C, NCOA3, REST, RTN4, SETD2, SMAD7, SOX5, TCF21, TGFB3, TP63</i>	0,00015
Diferenciação de Células Endoteliais	7	<i>BMPT2, ICAM1, IL1B, JAG1, MYD88, PLOD3, VEGFA</i>	0,0009
Morfogênese do tubo epitelial	11	<i>APAF1, BCL2, COL4A1, MEF2C, NCOA3, SETD2, SPRY2, TCF21, TGFB2, TGF1, VEGFA</i>	0,0024
Regulação da ativação por estresse da cascata MAPK	8	<i>DAXX, DUSP10, IGF1R, IL1B, MYD88, PDCD4, RASGRP1, VEGFA</i>	0,0038
Regulação negativa da proteína serina-treonina-quinase	6	<i>DUSP10, IL1B, PDCD4, PTEN, SPRY2, TNFAIP3</i>	0,0093
Sinalização da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K)	5	<i>ERBB2, IGF1R, PTEN, RSGRP1, SIRT2</i>	0,0157
Via de sinalização do receptor de androgênio	4	<i>DAXX, NCOA3, SMARCA4, TCF21</i>	0,0256
Gênese de gametas femininos	4	<i>BCL2, HPGD, IL1B, SIRT2</i>	0,0449
Funções Moleculares	Número de Genes	Genes Alvo	P-valor
Ligação ao receptor de androgênio	4	<i>DAXX, NCOA3, SMARCA4, TCF21</i>	0,0169
Ligação ao fator de crescimento	6	<i>BMPT2, COL4A1, ERBB2, IGF1R, TGFB2, TGFB3</i>	0,0169
Ligação ao receptor de hormônios esteroides	5	<i>DAXX, NCO3, SMARCA4, STAT3, TCF21</i>	0,0169
Atividade transmembrana da proteína serina-treonina quinase	3	<i>BMPT2, TGFB2, TGFB3</i>	0,0199

Tabela 11- Verificações das vias de sinalização, encontradas em análise nos bancos de dados biomédicos KEGG e vias Wiki, relacionadas ao miR-21-5p. As vias de sinalização descritas foram selecionadas por representarem funções que podem estar relacionadas à fisiopatologia da SOP

Vias KEGG	Número de Genes	Genes Alvo	P-valor
Via de sinalização MAPK	12	<i>AKT2, DAXX, DUSP10, EGFR, FASLG, IL1B, MAP2K3, MEF2C, NTF3, RASA1, RASGRP1, TGFB2</i>	<0,00001
Via de sinalização FOXO	8	<i>AKT2, BCL6, EGFR, FASLG, IGF1R, PTEN, SATAT3, TGFB2</i>	0,00004
Via de sinalização TGFβ	5	<i>BMPT2, GDF5, SMAD7, SP1, TGFB2</i>	0,0014
Via de sinalização PI3K-AKT	8	<i>AKT2, BCL2, COL4A1, EGFR, FASLG, IGF1R, PTEN, VEGFA</i>	0,0063
Via de sinalização mTOR	3	<i>AKT2, PTEN, VEGFA</i>	0,0396
Via de sinalização da adipocitocina	3	<i>AKT2, PPARA, SATAT3</i>	0,0471
Vias Wiki	Número de Genes	Genes Alvo	P-valor
Via de sinalização do receptor de androgênio	9	<i>DAXX, EGFR, NCOA3, PIAS3, PTEN, RHOB, SP1, STAT3, TGIF1</i>	<0,00001
Via de sinalização MAPK	11	<i>AKT2, DAXX, DUSP10, EGFR, FASLG, IL1B, MAP2K3, MEF2C, RASA1, RASGRP1, TGFB2</i>	<0,00001
Via de sinalização do TGFβ	8	<i>MAP2K3, MEF2C, SMAD7, SP1, TGFB2, TGFB3, TGIF1, WWP1</i>	0,00001
Via de sinalização do receptor de estrogênio	3	<i>PPARA, SP1, STAAT3</i>	0,0010
Adipogênese	5	<i>E2F1, MEF2C, PPARA, SPA1, STAAT3</i>	0,0077
Via de sinalização da leptina	4	<i>ERBB2, IL1B, SP1, STAAT3</i>	0,0098
Angiogênese	3	<i>TIMP3, VEGFA</i>	0,0462
Via de sinalização do estrogênio	2	<i>BCL2, SP1</i>	0,0462

5 DISCUSSÃO

A SOP é uma condição complexa que exibe uma interação entre características clínicas como hiperandrogenismo, distúrbio menstrual, ovários de padrão policístico, resistência à insulina e outras alterações metabólicas^{12, 14}. Embora ainda não estejam completamente entendidos, sabe-se que pode haver uma pré-disposição genética, que é influenciada por fatores ambientais e epigenéticos⁷. O objetivo desse estudo foi explorar marcadores epigenéticos que possam contribuir para o entendimento da fisiopatologia e serem estudados no diagnóstico da SOP. O presente estudo demonstrou que há o aumento da expressão do miR-21-5p no soro de mulheres com SOP em relação a mulheres sem a síndrome. O miR-21-5p mostrou alto potencial de aplicabilidade clínica quando foi comparado ao AMH, já amplamente estudado como marcador da síndrome^{159, 160}.

Após a seleção de 201 miRNAs circulantes com potencial para influenciar na fisiopatologia da síndrome, procedeu-se com a avaliação dos seus perfis de expressão em uma população bem caracterizada de mulheres com SOP. A partir desses achados, selecionaram-se os melhores candidatos a marcadores para o processo de validação, e o miR-21-5p apresentou-se como promissor.

Alguns estudos anteriores também avaliaram a expressão diferencial do miR-21 no soro de mulheres com SOP e tiveram resultados conflitantes. Enquanto no trabalho de Sorensen A et al.²⁰⁷ houve hipoexpressão desse miRNA no soro de mulheres com SOP, quando comparadas a mulheres saudáveis, no estudo de Jiang et al.²⁰⁸ ele estava hiperexpresso. Entretanto, o primeiro estudo avaliou o miR-21-3p, enquanto no segundo, o miR-21 avaliado foi o miR-21-5p.

Nossos resultados mostram que, embora a expressão diferencial do miR-21-3p não foi estatisticamente significativa, este miRNA apresentou hipoeexpressão no soro de mulheres com SOP em relação às mulheres controles, enquanto o miR-21-5p mostrou hiperexpressão, corroborando com os estudos anteriores. Outro estudo¹⁸² não encontrou diferença de expressão sérica do miR-21 entre mulheres com SOP e mulheres controles saudáveis. Entretanto, esse estudo não especificou qual miR-21 foi estudado. Apesar disso, a análise funcional e a rede de interação desse miRNA com seus possíveis alvos demonstradas no trabalho sugerem que o miRNA avaliado seja o miR-21-5p.

Os miRNAs -5p ou -3p são assim denominados devido à ordem de aparecimento e da direção de transcrição dessas fitas: o miRNA -5p inicia pela fita 5p (5'-3'); e o miRNA -3p, pela fita 3p (3'-5'). Ambos são considerados formas maduras de miRNA e se formam após a clivagem da alça do miRNA precursor pela enzima DICER^{118, 131}. Logo, suas sequências de bases nitrogenadas são complementares. Devido a isso, suas moléculas diferem quanto à estabilidade e à função biológica, apresentando alvos genéticos e redes de interação diferentes. Geralmente, o miRNA mais estável liga-se ao complexo RISC, enquanto o outro sofre degradação¹³¹. Em alguns casos, entretanto, as duas moléculas podem exercer funções biológicas, embora distintas, como é o caso dos miR-21^{209, 210}. Pela base de dados de miRNAs miRBase (www.mirbase.org), o miR-21-5p parece ser a molécula mais abundante, sugerindo que este miRNA possa ser mais estável. Em um estudo, este miRNA foi o miRNA mais abundante encontrado em células da granulosa ovarianas e ligado ao complexo RISC²¹¹. Entretanto, o papel que ambas moléculas representam na fisiopatologia da SOP ainda é desconhecido.

Murri M et.al.²¹² avaliou a diferença de expressão do miR-21-5p no soro de mulheres com SOP em comparação ao soro de mulheres sem a síndrome e de homens. Foi encontrado que na SOP houve uma tendência a maior expressão do miR-21-5p em mulheres com sobrepeso/obesidade em relação às mulheres eutróficas com a síndrome, ao contrário do que foi observado nos grupos de mulheres sem a síndrome e de homens, nos quais o miR-21-5p estava hipoexpresso em participantes com sobrepeso/obesidade em relação aos eutróficos, sugerindo que o IMC pudesse interferir na expressão sérica do miR-21-5p. Esse estudo, entretanto, contou com um tamanho amostral muito pequeno (6 em cada grupo), limitando a consistência desses achados. No presente estudo, contando com um número maior de participantes, não houve diferença de expressão sérica do miR-21-5p entre mulheres com SOP e sobrepeso/obesidade e eutróficas, nem entre mulheres controles com essas características. As diferenças de expressão entre as mulheres com SOP e controles, entretanto, persistiram mesmo após serem subdivididas de acordo com o IMC, sugerindo que outros fatores, que não a massa corporal, possam estar relacionados à essas diferenças encontradas entre os dois grupos. Apesar disso, o miR-21 vem sido descrito como um dos miRNA participantes na adipogênese²¹³, mas não é sabido se este miRNA desempenha papel diferente na adipogênese de mulheres com SOP.

O estudo de Murri M. et al.²¹² demonstrou, ainda, um potencial papel das concentrações de testosterona livre na regulação positiva do miR-21-5p. Já no trabalho de Naji, M et al.¹⁸², esse miRNA estava diminuído no soro das mulheres com SOP hiperandrogênicas, embora de maneira não significativa. No presente estudo, também não foi encontrada diferenças significativas na expressão do

miR-21-5p no soro de mulheres com SOP com e sem hiperandrogenemia, mas apenas o grupo de SOP hiperandrogênica apresentou hiperexpressão desse miRNA em relação a mulheres controles. Não foi encontrado, ainda, diferenças na expressão desse miRNA entre os fenótipos hiperandrogênicos da SOP quando comparados ao fenótipo normoandrogênico, sugerindo que talvez este não seja o único fator determinante na diferença de expressão circulante desse miRNA entre SOP e controle. O fato de o trabalho do Murri M et al.²¹² incluir a população masculina na sua análise pode ter aumentado a variação dos níveis de testosterona no estudo e, por isso, ter encontrado uma relação significativa entre esse hormônio e o miR-21-5p. Análise *in silico* desse miRNA demonstra que o miR-21-5p pode exercer função nas vias de sinalização do receptor de androgênio. Pode ser, portanto, que a relação que esse miRNA tenha com os androgênios seja por meio do aumento da sensibilidade do seu receptor e, não, por se relacionar com a hiperandrogenemia. No presente estudo, apesar da expressão média desse miRNA ser superior no grupo com SOP com hirsutismo em relação ao grupo sem essa característica, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Entretanto, diferenças de expressão do miR-21 entre homens e mulheres²¹⁴ podem explicar a diferença na quantidade de receptor de androgênio entre os sexos²¹⁵.

Além do hiperandrogenismo, mulheres com SOP apresentam aumento na prevalência de resistência à insulina quando comparadas com mulheres sem a síndrome¹⁴. Apesar de não fazer parte dos critérios diagnósticos da SOP, esta característica contribui para sua fisiopatologia, potencializando o efeito do LH nas células da teca e diminuindo as concentrações de SHBG, e assim, aumentando os níveis séricos de androgênios livres^{56, 94}. Além disso, a

resistência à insulina está relacionada com o aumento do risco metabólico, em especial, de diabetes mellitus tipo 2, relacionados à SOP^{13, 14}.

Em estudos em mulheres diabéticas do tipo 2, o aumento do miR-21-5p foi associado com a severidade da doença, bem como com suas disfunções vasculares, como a retinopatia e a nefropatia diabética^{216, 217}. Este fato pode estar relacionado a alta expressão desse miRNA em tecidos vasculares e sua relação com genes relacionados à regulação da proliferação e apoptose de células musculares lisas do tecido vascular²¹⁸. Sua ação na angiogênese, no contexto do diabetes, foi relacionada a supressão dos seus alvos, *PTEN* e *Bcl-2*, por meio da via de sinalização PI3K-AKT²¹⁸, via que também está desregulada em mulheres com SOP e resistência à insulina⁹³. Além disso, outro estudo revelou uma diminuição do miR-21-5p nas células musculares lisas vasculares após o tratamento com metformina, sob condições diabéticas, resultando na hiperexpressão do *PTEN*, reduzindo a fosforilação da via PI3K-AKT²¹⁹.

Outro gene enriquecido na análise *in silico* do miR-21-5p deste estudo, e relacionado com a angiogênese ovariana via PI3K-AKT, é o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*). Este gene tem sido descrito como um mediador chave na vascularização anormal nas células da granulosa de mulheres com SOP²²⁰ e pode contribuir parcialmente para o estroma denso hipervascularizado observado nos ovários dessas mulheres. Além disso, a insulina pode estimular a produção de VEGF, e o aumento da sua concentração plasmática, em mulheres com SOP, foi relacionada com a síndrome do hiperestímulo ovariano e diminuição das taxas de ovulação²²¹.

Em nosso estudo, não foi encontrada diferença de expressão deste miRNA entre mulheres com SOP com e sem resistência à insulina. Entretanto, quando

avaliamos as diferenças de expressão do miR-21-5p em relação as concentrações de SHBG, encontramos um aumento da expressão desse miRNA no grupo com diminuição das concentrações séricas dessa globulina. A diminuição da SHBG está relacionada tanto com a resistência à insulina quanto com o hiperandrogenismo e, portanto, é considerada forte preditora de diabetes mellitus tipo 2²²².

Outros trabalhos em populações de mulheres com SOP buscaram avaliar a relação entre os miRNAs e a resistência à insulina na síndrome. Jiang L et al.¹⁷⁶ encontrou que os miR-122, miR-194 e miR-193b estavam diferencialmente expressos entre mulheres com SOP tolerantes e intolerantes à glicose. Neste estudo, esses miRNAs se relacionaram com o HOMA-IR. O aumento das concentrações circulantes do miR-122 também foi fortemente associado com o risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 na população em geral²²³. Já Song K et al.²²⁴ encontrou que o miR-6767 estava hipoexpresso no soro de mulheres sul-coreanas com SOP em relação à controles saudáveis. Esse miRNA se correlacionou positivamente com as concentrações de SHBG e negativamente com as concentrações de glicose. Jiang B et al.²²⁵, por outro lado, encontrou relação da expressão sérica do miR-204 com o desenvolvimento de resistência à insulina na SOP. No presente estudo, os miR-122-5p, miR-194-5p não apresentaram diferenças de expressão entre mulheres SOP em relação às mulheres controles, e a expressão dos miR-193b, miR-6767 e miR-204 apresentaram expressão insuficiente para a realização de qualquer tipo de análise. Nesses estudos prévios, a relação entre o miR-21-5p e a resistência à insulina na SOP não foi determinada.

As diferenças encontradas na relação entre a expressão de miRNA e resistência à insulina entre estudos pode ser devido a diferenças populacionais, como etnia, critérios de inclusão e exclusão, diferenças técnicas relacionadas a análise dos miRNAs e critérios diagnósticos de SOP. Nenhuma participante do nosso estudo tinha diagnóstico de diabetes mellitus tipo II e apenas duas participantes com SOP apresentaram intolerância à glicose. Logo, pode ser que em estágios precoces das disfunções relacionadas ao diabetes, como a resistência à insulina, o miR-21 e o miR-122 não sejam bons marcadores para avaliar o risco de desenvolver diabetes e suas complicações associadas. Pode ser também que a relação que o miR-21-5p tenha com a insulina seja por meio do aumento da sensibilidade do receptor de IGF-1 a esse hormônio, mesmo em concentrações normais de insulina. Isso se explica pelo fato que na análise *in silico* do nosso estudo, houve associação entre o miR-21-5p e o gene do receptor de IGF1. A expressão do miR-21, no entanto, mostrou-se aumentada em mulheres com SOP e diminuição da SHBG, mas se esse achado está relacionado com o aumento do risco de diabetes ainda está por ser determinado.

O uso do HOMA-IR ao invés do campleamento euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de resistência à insulina, pode ter sido um fator limitante para a avaliação da relação do miR-21-5p com esse diagnóstico. Entretanto, o HOMA-IR é o modelo mais utilizado na prática clínica para a avaliação de resistência à insulina, apresentando boa correlação com o padrão²²⁶. Além disso, a maioria dos estudos realizados em mulheres com SOP utilizaram esse modelo para avaliação de resistência à insulina, o que torna nossos resultados passíveis de comparação²²⁷. Também foi demonstrado, por meio de curvas glicêmicas e insulinêmicas, que as

mulheres com SOP no nosso estudo, resistentes e não resistentes à insulina de acordo com o ponto de corte utilizado, apresentam padrão de insulinemia e de glicemia bem distintos nessas curvas.

Além da avaliação das diferenças de expressão do miR-21-5p em relação à parâmetros relacionados à resistência à insulina, o presente estudo buscou avaliar a expressão desse miRNA em relação a outros parâmetros de aumento do risco metabólico na SOP. Não foi encontrada diferenças de expressão desse miRNA entre mulheres com SOP com e sem síndrome metabólica, e com e sem aumento do VAI e LAP, sugerindo que o aumento da expressão sérica do miR-21 na SOP não está relacionado a esses fatores. Entretanto, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, parece haver um aumento da expressão do miR-21-5p em mulheres com SOP dislipidêmicas, e esse aumento foi estatisticamente significativo em relação às mulheres controles.

A dislipidemia é fator de risco para aumento do risco cardiovascular²²⁸. Estudos anteriores demonstram que a dislipidemia na SOP está relacionada principalmente à diminuição do HDL-C e aumento dos triglicerídeos^{100, 102}. A relação triglicérides/HDL-C representa esta alteração e foi associada a um aumento do risco de intolerância à glicose e doença cardiovascular em mulheres com SOP²⁰⁰. O papel dos miRNAs na dislipidemia tem sido investigado²²⁹, porém a relação entre o miR-21-5p e essa condição ainda não foi encontrada.

Além disso, uma das formas de circulação dos miRNAs no soro é ligada ao HDL-C¹⁴². É improvável, entretanto, que essa diminuição das concentrações séricas de HDL-C possa ter sido a causa do aumento da expressão do miR-21-5p no soro, uma vez que os reagentes utilizados na etapa de extração de miRNAs neste estudo isolam a quantidade total de miRNAs circulantes,

independente do meio de circulação. No entanto, pode ser que esse aumento do miR-21-5p em pacientes dislipidêmicas, esteja relacionado, indiretamente, com o aumento das disfunções vasculares relacionadas à dislipidemia. Análise de anormalidades vasculares dessas mulheres foge do escopo do presente estudo, mas levanta a possibilidade para estudos futuros.

Apesar de não ter sido encontrada uma relação significativa da expressão do miR-21-5p com as principais características hormonais e metabólicas da SOP neste estudo, este miRNA é altamente expresso no tecido ovariano²³⁰ e está associado a uma série de funções biológicas e vias de sinalização que participam de processos fisiopatológicos da síndrome.

O miR-21-5p foi originalmente identificado como um gene regulador de LH/hCG em um modelo murinho de células da granulosa ovariana²³¹, promovendo sobrevivência folicular durante a ovulação. Posteriormente, o estudo de Mase Y et al.²¹¹ utilizou cultura de células da granulosa humanas para silenciar o miR-21-5p. Foi demonstrado que o silenciamento deste miRNA diminuiu as taxas de ovulação, confirmando seu papel anti-apoptótico e sua importância funcional no ovário. Além disso, este estudo identificou que o mRNA alvo deste miRNA nas células da granulosa era o *COL4A1*, sugerindo que o miR-21-5p age regulando sua síntese. Este mRNA é um importante componente da membrana basal que envolve a camada de células da granulosa e suas estruturas extracelulares. O miR-21-5p não foi identificado em células da teca ovariana nem em óocitos^{232, 233}, sugerindo que sua ação no ovário seja específica das células da granulosa ou de outras células do *cumulus*²³⁴.

A disfunção das células da granulosa pode contribuir para a foliculogênese anormal observada na SOP^{62, 235}. Os ovários na SOP têm o dobro

do número de folículos em crescimento em todos os estágios do desenvolvimento⁶². A proliferação das células da granulosa está aumentada nos ovários de mulheres com SOP anovuladoras quando comparada a células da granulosa de controles saudáveis e de SOP ovuladoras^{236, 237}. Os mecanismos responsáveis por essas altas taxas de proliferação celular, entretanto, ainda não foram elucidados. Na predição dos processos biológicos, realizada por meio de ferramentas de bioinformática no nosso estudo, funções moleculares e vias de sinalização relacionadas ao miR-21-5p e envolvidas na fisiologia da foliculogênese, bem como com os processos de proliferação celular e apoptose foram encontradas. Essas vias de sinalização correspondem às vias MAPK, FOXO, PI3K-AKT, mTOR e TGF β ^{93, 238, 239}.

Os membros da família dos fatores transformadores de crescimento β (TGF β) são moléculas de sinalização muito estudadas no processo de foliculogênese, ovulação e fertilidade²⁴⁰⁻²⁴³. Um estudo demonstrou que o TGF β aumenta a expressão do miR-21-5p por meio da via de sinalização SMAD3²⁴⁴. Essa via foi relacionada com o processo de crescimento, diferenciação e atresia folicular²⁴¹. Outro estudo identificou que a maioria dos genes sinalizadores dessa via estão desregulados nas células do *cumulus* de mulheres com SOP, incluindo os genes *TGFRs* e os *SMADs*²³⁸. Para identificar o papel que o miR-21-5p desempenha nos mecanismos de proliferação folicular de mulheres com SOP, alguns estudos foram realizados. Enquanto que Jiang L et. al.²⁰⁸ não encontrou diferença de expressão do miR-21-5p nas células ovarianas entre mulheres SOP e controles, Lu J et. al.²⁴⁵, mostrou que o miR-21-5p estava hiperexpresso em células da granulosa de mulheres com SOP e que sua inibição foi associada à redução da proliferação celular e ao aumento da apoptose. Já Naji M et al.¹⁸²

demonstrou que a expressão do miR-21-5p estava aumentada nas células da granulosa de mulheres com SOP hiperandrogênicas ao mesmo tempo que sua expressão estava reduzida no fluido folicular dessas mulheres. Nesses ovários, foi demonstrada a hipoexpressão de genes *TGFBR2* e *SMAD7*, ambos associados à via de sinalização do TGF β . Esses genes também mostraram ter associação com o miR-21-5p na nossa análise *in silico*.

Além disso, outro estudo, realizado em mulheres com infertilidade de causa ovulatória de etiologia variada investigou o potencial diagnóstico dos miRNAs miR-21-5p, miR-199a-3p e let-7i-3p na infertilidade feminina²⁴⁶. Este estudo identificou que a expressão do miR-21-5p estava diminuída, e a do miR-199a-3p aumentada, no soro de mulheres inférteis com concentrações baixas ou altas de AMH. O miR-21-5p apresentou uma chance de 81% de distinguir mulheres inférteis de férteis, e de 98% quando associado ao miR-199a-5p. Este estudo apontou o potencial desses miRNAs no diagnóstico da infertilidade de causa ovulatória, independente das concentrações de AMH.

Neste presente trabalho, não foi possível estudar a relação do miR-21-5p com o quadro de ovulação ou infertilidade, pois houve baixa prevalência do fenótipo ovulatório da síndrome^{7, 36} na população recrutada, e a maioria das participantes (cerca de 60%) não tiveram sua fertilidade testada no momento do recrutamento. Além disso, as que referiram quadro de infertilidade no passado não sabiam qual a causa primária desse diagnóstico, dificultando uma análise mais detalhada. Devido a isso, a relação do miR-21-5p com o diagnóstico de infertilidade por fator ovulatório relacionado à SOP, na nossa população, ainda está por ser investigado.

Apesar disso, e somado aos resultados de estudos realizados até o momento, supõe-se que a hiperexpressão do miR-21-5p encontrada no soro de mulheres com SOP esteja relacionada à proliferação disfuncional das células da granulosa, principalmente em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular, ou de outras células do *cumulus*, e de células da musculatura lisa vascular ovariana. Entretanto, apesar das diferenças encontradas na expressão circulante do miR-21-5p entre mulheres com SOP e controles, ainda não se conhece a real origem deste miRNA, nem se ele realmente desempenha função em algum órgão. A identificação de miRNAs no sangue e em outros fluidos celulares é relativamente recente e tem sido um estímulo para o desenvolvimento de pesquisas com dois objetivos: primeiro, se estas moléculas são úteis como biomarcadores de doença e, em segundo lugar, se servem como uma nova forma de comunicação intercelular e inter-tecidual¹³³.

Em resumo, nosso estudo identificou o miR-21-5p como possível marcador diagnóstico para SOP, uma vez que estava diferencialmente expresso no soro das mulheres com a síndrome. Ao que parece, até o momento, este foi o primeiro estudo a sugerir o potencial do miR-21-5p em discriminar a população com SOP da população geral. Além disso, quando analisado em conjunto com o AMH, o miRNA em questão aumentou sua sensibilidade como marcador diagnóstico. Nossos achados podem contribuir para o uso mais racional e objetivo de marcadores no diagnóstico da SOP, bem como na predição de alterações metabólicas e reprodutivas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A avaliação do perfil de expressão identificou 14 microRNAs circulantes diferencialmente expressos nas pacientes com a síndrome dos ovários policísticos. Desses, foram selecionados sete para validação individual, devido à expressão mais significativa.
- O miR-21-5p circulante mostrou-se hiperexpresso nas pacientes com SOP e foi considerado como potencial marcador diagnóstico, uma vez que conseguiu identificar 81% das mulheres com a síndrome.
- A chance de discriminar a população com SOP em relação à população em geral aumentou para 92% quando o miR-21-5p foi combinado a concentração de hormônio anti-mülleriano (AMH). A sensibilidade desta associação foi de 91,4% e a especificidade de 87,5%, com valores preditivos positivo e negativo de 94,1% e 82,4%, respectivamente.
- A expressão do miR-21-5p não se relacionou com o IMC, resistência à insulina, fenótipos da SOP, presença de síndrome metabólica e aos critérios de risco metabólico, como o índice de adiposidade visceral (VAI) e o produto de acumulação lipídica (LAP).

- A presença de hirsutismo, hiperandrogenemia ou relação Triglicerídeos/HDL-C > 3 amplificou a hiperexpressão do miR-21-5p nas pacientes com SOP.
- A análise *in silico* (bioinformática) das interações do miR-21-5p identificou 14 genes-alvo e 5 vias de sinalização associadas à SOP e as comorbidades relacionadas à síndrome.

Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - **Análise do Perfil de miRNAs e Metabólitos Plasmáticos em Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos e Pacientes Controles**

Pesquisador principal - Gustavo Arantes Rosa Maciel

Departamento/Instituto - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ ICHC

Você está sendo convidada a participar, voluntariamente, de um estudo que será realizado no Setor de Ginecologia Endócrina do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. O estudo incluirá 3 grupos de pacientes: um grupo com diagnóstico de Síndrome dos Ovários Policísticos sem pré-diabetes outro grupo com pacientes com síndrome porém com pré-diabetes; e um terceiro grupo controle (pacientes com ciclos menstruais regulares e sem a síndrome).

Esse formulário de consentimento explicará a finalidade e os detalhes deste estudo. Explicará também as suas responsabilidades e seus direitos como participante.

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.

O objetivo deste estudo é verificar se existem diferenças hormonais, genéticas ou metabólicas entre mulheres com a síndrome e mulheres sem a doença. Além de verificarmos se existe diferenças quanto a estas mesmas características em pacientes com a síndrome, porém com e sem pré-diabetes.

Juntamente com você, caso você aceite, participarão 20 mulheres em (cada grupo), totalizando 60 participantes.

Durante seu atendimento, você deve informar ao médico sobre todas as doenças atuais e tratamentos aos quais você fora ou está sendo submetida.

Serão coletados dados clínicos e demográficos de todas as participantes, bem como todas serão submetidas a exame físico geral, informações de peso e altura e avaliação de sinais vitais, coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço e exame clínico. Serão coletados aproximadamente cinco tubos de ensaio de 5 ml. Cada tubo tem a quantidade de sangue equivalente a uma colher de sopa.

Os dados coletados serão confidenciais e apenas utilizados para a pesquisa.

A pesquisa visa obter dados do seu metabolismo bem como de suas características genéticas.

Não haverá benefícios diretos às pacientes envolvidas.

Não é esperado que sua participação neste estudo acarrete em problemas de saúde para você. Entretanto, caso algum problema médico decorra diretamente de sua participação na pesquisa, é garantido a você tratamento para todos estes problemas médicos, bem como a solicitação de indenização por eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é Dr Gustavo Arantes Rosa Maciel, que conta com o apoio da Dra Giovana De Nardo Maffazioli, que podem ser encontradas 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: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Não serão cobrados custos dos participantes em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.

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 médico do grupo da Ginecologia que conduz seu atendimento. Isto é para sua própria segurança.

Você deverá compreender também que sua participação poderá ser encerrada, pelo médico responsável pelo atendimento, a qualquer tempo, se ele julgar ser o melhor para você. Você também será informado de toda e qualquer novo fato que possa influenciar a sua intenção de continuar ou não a participar deste estudo.

Após ler o presente documento, declaro que fui suficientemente informado a respeito do estudo "Análise do Perfil de miRNAs e Metabólitos Plasmáticos em Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos e Pacientes Controles"

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr Gustavo Arantes Rosa Maciel sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante
legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE 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 (.....)

Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Perfil de miRNAs e Metabólitos Plasmáticos em Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos

Pesquisador: GUSTAVO ARANTES ROSA MACIEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87894518.0.0000.0068

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

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.622.258

Apresentação do Projeto:

O projeto pretende avaliar o perfil de miRNAs e Metabólitos em portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos, para isso utilizarão um painel de expressão de MicroRNAs plasmáticos selecionados relacionados à SOP, metabolismo, resistência à insulina e risco para diabetes melito do tipo 2 será analisado por meio de PCR array quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Além disso, os pesquisadores irão analisar um de perfil de 186 metabólitos plasmáticos (targeted metabolomic) relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas por meio de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) com ionização por electrospray (ESI). Como os pacientes já são acompanhados clinicamente no ambulatório, a coleta será realizada junto com os exames normais de rotina, mas será aplicado o termo de consentimento adequado para esta pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as diferenças clínicas, moleculares e metabolômicas das pacientes com a síndrome dos ovários policísticos com e sem intolerância à glicose e em pacientes controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos normais da punção de sangue periférico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e será submetido à FAPESP.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.409-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.622.258

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou todos os documentos e anuências necessárias de forma adequada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_967263.pdf	18/04/2018 08:49:11		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_asinada.pdf	18/04/2018 08:48:53	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
Outros	carta_custo.pdf	10/04/2018 10:38:45	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
Outros	carta_compromisso.pdf	10/04/2018 10:36:42	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
Outros	carta_anuencia_LIM_58.doc	10/04/2018 10:36:23	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
Outros	lpaq-versao-longa-questionario.pdf	10/04/2018 10:36:01	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
Outros	Questionario_clinico_SOP.docx	10/04/2018 10:35:38	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final_grupos.doc	10/04/2018 10:33:58	GUSTAVO ARANTES ROSA MACIEL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mirna_PCOS.doc	10/04/2018 10:33:28	GUSTAVO ARANTES ROSA MACIEL	Aceito
Outros	aprovacao_cep.pdf	03/04/2018 08:59:32	GUSTAVO ARANTES ROSA	Aceito

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: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.622.258

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Abril de 2018

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

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:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C: Protocolo de Avaliação Clínica e Laboratorial

PROTOCOLO PRIMEIRA CONSULTA SOP

ETIQUETA:

Data 1ª consulta: _____
Etnia: () Branca () Negra () Parda () Outra _____
Grau de Instrução: _____
Renda Familiar: _____
Telefone: _____

Quadro Clínico:

- a) Acne: () Sim () Não
b) Aumento de Pelos: () Sim () Não
c) Queda de Cabelos: () Sim () Não
d) Alteração Menstrual: () Sim () Não
 - Qual? () Amenorreia () Oligomenorreia () Hipermenorreia
e) Infertilidade: () Sim () Não - Tipo: () Primária () Secundária
 - Tempo de Infertilidade: _____

Tratamento Anterior: () Sim () Não

- Qual? _____
- Data da última tomada _____

Outras Patologias:

- Diabetes: () Não () Sim - Tipo I/TipolII - EXCLUIR
Doença Coronariana: () Não () Sim - EXCLUIR
Acidente Vascular Cerebral: () Não () Sim - EXCLUIR
Câncer: () Não () Sim - Qual? _____ - EXCLUIR
Cirrose: () Não () Sim - EXCLUIR
Doença autoimune: () Não () Sim - Qual? _____ - EXCLUIR
HAS () Não () Sim
Outras: () Não () Sim - Qual? _____ - ANALISAR

CASO A CASO

- Cirurgias prévias () Não () Sim - Qual? _____

Uso de Medicções:

- ACO/Progestagenos: () Não () Sim - Qual? _____ - EXCLUIR
Glicocorticoides: () Não () Sim - EXCLUIR
Hipoglicemiantes: () Não () Sim - Qual? _____ - EXCLUIR
Estatinas/fibrato: () Não () Sim - Qual? _____ - EXCLUIR
Outras: () Não () Sim - Qual? _____
_____ - ANALISAR CASO A CASO

História Gineco-Obstétrica:

Idade da Telarca: _____ Pubarca: _____

Idade da Menarca: _____

Gesta _____ Para _____ Tempo desde última gestação: _____

OBS: excluir se menos de 1 ano da última gestação

Peso RNS: _____

Método Contraceptivo: _____

Peso ao Nascimento: _____

DUM: _____

Antecedentes Familiares:

Hipertensão () Não () Sim Quem? _____

Diabetes tipo 1 () Não () Sim Quem? _____

Diabetes tipo 2 () Não () Sim Quem? _____

Hipotireoidismo () Não () Sim Quem? _____

Obesidade () Não () Sim Quem? _____

SOP () Não () Sim Quem? _____

Consanguinidade () Não () Sim Quem? _____

Exame Físico:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ CA: _____ CQ: _____

PA: _____

Acne: () Não () Grau I () Grau II () Grau III () Grau IV

Alopécia: () Não () Sim

Engrossamento da voz: () Não () Sim

Clitoromegalia: () Não () Sim

Acantose Nigricans: () Não () Pescoço () Axila () Tórax () R. Inguinal

Hirsutismo (Ferriman-Gallway Score)

Buço:	Dorso:
Mento:	Braço:
Tórax:	Nádegas:
Linha Supra:	Coxas:
Linha Infra:	Score:

Exames Laboratoriais:

Data: ____/____/____ Tempo desde última menstruação: _____

Jejum: () Não () Sim

FSH		Glicemia jejum	
LH		Insulina jejum	
Prolactina		HbA1c	
TSH		25OHD	
T4 livre		Proteína C Reativa	
SDHEA		Colesterol Total	
17-OHP		Colesterol LDL	
Androstenediona		Colesterol HDL	
Testo total		Colesterol VLDL	
Testo livre		Triglicerídeos	
SHBG		TGO	
Estradiol		TGP	

TTGO 75g	0	30	60	90	120
Glicemia					
Insulina					

USTV	Útero (vol)	EE (cm)	OD (vol)	OE (vol)	Policístico
Data:					

US ABD: _____

Checklist:

Grupo: () Controle () SOP saudável () SOP intolerante

TCLE: () Não () Sim

Sangue: () Não () Sim – frascos 2 tubos roxos e 4 amarelos

IPAQ () Não () Sim

Anamnese Nutricional () Não () Sim

Recordatório de 24 horas () Não () Sim

Anexo D: Exames Laboratoriais, Método de Análise e Valores de Referência

Analito	Método
FSH	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 1,7-21,5 IU/L
LH	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 1-95,6 IU/L
Prolactina	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 4,2-24,2 ng/mL
TSH	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 0,45-4,5 µIU/mL
T4 Livre	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 0,93-1,70 ng/dL
SDHEA	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: : 339-4070 ng/mL
17-OHP	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem Valor de Referência: 0,86-1,10 ng/mL
Androstenediona	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem Valor de Referência: 0,25-2,20 ng/mL
Testosterona Total	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: < 52 ng/dL
Testosterona Livre	Cálculo baseado na testosterona total e SHBG Valor de Referência: 2,4-37 ng/dL
SHBG	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 32,4-128 ng/mL
Estradiol	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: até 498 pg/mL
Glicemia de jejum	Hexoquinase Valor de Referência: 70-99mg/dL
Insulina de Jejum	Eletroquimioluminescência (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: 2,6 a 24,9 µU/mL
Hemoglobina Glicada	Cromatografia líquida de alta eficiência Valor de Referência: 5,7-6,4% (intolerância à glicose)
25OH vitamina D	Químioinunoensaio Valor de Referência: 30-100 ng/mL
Proteína C Reativa	Ensaio Imunoturbidimétrico Valor de Referência: <5,0 mg/L
Colesterol Total	Ensaio enzimático colorimétrico automatizado Valor de Referência: até 200 mg/dL
Colesterol LDL	Ensaio cinético automatizado Valor de Referência: até 100 mg/dL
Colesterol HDL	Ensaio enzimático colorimétrico automatizado Valor de Referência: ≥50 mg/dL

Colesterol VLDL	Ensaio cinético automatizado Valor de Referência: <30mg/dL
Triglicerídeos	Ensaio enzimático colorimétrico automatizado Valor de Referência: ≤150 mg/dL
TGO	Ensaio cinético automatizado Valor de Referência: Inferior a 31 U/L
TGP	Ensaio cinético automatizado Valor de Referência: Inferior a 31 U/L
AMH	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELECSYS® Roche) Valor de Referência: entre 1,2 e 3,4 ng/mL

FSH: Hormônio Folículo Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; TSH: Hormônio Tireoestimulante; T4 Livre: Tiroxina Livre; SDHEA: Sulfato de Deidroepiandrosterona; 17-OHP: 17α-hidroxi progesterona; SHBG: Globulina Ligadora dos Hormônios Sexuais; 25OH vitamina D: 25-hidroxi vitamina D; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica; AMH: Hormônio anti-mulleriano

Anexo E: Análise de Enriquecimento de Processos Biológicos, Funções Moleculares e Vias de Sinalização

GO - Biological Process

Type	Name	#Hits	Expected score	p-Value
enriched	gland morphogenesis(5)	10	0.862265	0.000043
enriched	glial cell differentiation(6)	11	1.089530	0.000043
enriched	morphogenesis of a branching structure(4)	11	1.310110	0.000149
enriched	stem cell differentiation(6)	12	1.664370	0.000149
enriched	cellular response to decreased oxygen levels(6)	9	0.822159	0.000150
enriched	positive regulation of nitric oxide metabolic process(5)&positive regulation of nitric oxide biosynthetic process(6)	6	0.247316	0.000150
enriched	cellular response to oxygen levels(5)	9	0.882317	0.000203
enriched	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage(6)	8	0.668422	0.000224
enriched	positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process(5)	6	0.280737	0.000224
enriched	regulation of nitric oxide biosynthetic process(5)	6	0.314158	0.000395
enriched	cellular response to hypoxia(5)	8	0.808791	0.000775
enriched	chondrocyte differentiation(6)	7	0.568159	0.000775
enriched	endothelial cell differentiation(7)	7	0.588211	0.000905
enriched	endothelium development(6)	7	0.661738	0.001856
enriched	epithelial cell apoptotic process(8)	6	0.454527	0.002396
enriched	epithelial tube morphogenesis(5)	11	2.058740	0.002422
enriched	intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator(7)	6	0.467895	0.002422
enriched	negative regulation of cell development(5)	10	1.691110	0.002422
enriched	positive regulation of behavior(3)	7	0.728580	0.002593
enriched	positive regulation of sequence specific DNA binding transcription factor activity(5)	9	1.363580	0.002661
enriched	negative regulation of vasoconstriction(5)	3	0.046790	0.002839
enriched	mesenchyme development(5)	9	1.403690	0.002865
enriched	positive regulation of peptidyl serine phosphorylation(8)	6	0.508001	0.002865
enriched	smooth muscle cell migration(6)	5	0.294106	0.002865
enriched	extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors(7)	6	0.521369	0.003197
enriched	JNK cascade(7)	8	1.149690	0.003769
enriched	glomerulus development(4)	5	0.334211	0.003769
enriched	mesenchymal cell differentiation(6)	8	1.122950	0.003769
enriched	muscle cell proliferation(4)	7	0.828843	0.003769
enriched	positive regulation of smooth muscle cell migration(6)	4	0.160421	0.003769
enriched	regulation of stress activated MAPK cascade(6)	8	1.136320	0.003769
enriched	regulation of stress activated protein kinase signaling cascade(5)	8	1.143000	0.003769
enriched	kidney epithelium development(5)	7	0.855580	0.004048
enriched	organ growth(4)	7	0.848896	0.004048

enriched	regulation of germinal center formation(5)	3	0.060158	0.004048
enriched	muscle cell migration(5)	5	0.347580	0.004067
enriched	lung morphogenesis(5)	5	0.354264	0.004346
enriched	cardiac ventricle morphogenesis(5)	5	0.360948	0.004407
enriched	pathway restricted SMAD protein phosphorylation(8)	5	0.360948	0.004407
enriched	protein kinase B signaling(6)	7	0.882317	0.004407
enriched	transforming growth factor beta receptor signaling pathway(6)	8	1.223210	0.004476
enriched	morphogenesis of a branching epithelium(5)	8	1.229900	0.004498
enriched	renal tubule development(5)	6	0.608264	0.004498
enriched	eye morphogenesis(6)	7	0.902370	0.004517
enriched	activation of GTPase activity(7)	4	0.187158	0.004529
enriched	negative regulation of catabolic process(4)	8	1.256630	0.004734
enriched	stem cell proliferation(4)	7	0.915738	0.004734
enriched	regulation of JNK cascade(7)	7	0.935791	0.005228
enriched	artery development(5)	5	0.394369	0.005239
enriched	myelin maintenance(6)	3	0.073526	0.005239
enriched	negative regulation of peptidyl threonine phosphorylation(8)	3	0.073526	0.005239
enriched	positive regulation of chemotaxis(4)	6	0.648369	0.005239
enriched	pri miRNA transcription from RNA polymerase II promoter(8)®ulation of pri miRNA transcription from RNA polymerase II promoter(8)	3	0.073526	0.005239
enriched	negative regulation of cellular component movement(4)	8	1.316790	0.005663
enriched	nephron epithelium development(5)	6	0.661738	0.005663
enriched	necrotic process(7)	4	0.213895	0.006262
enriched	negative regulation of neurogenesis(5)	8	1.370270	0.007200
enriched	branching morphogenesis of an epithelial tube(5)	7	1.022690	0.007606
enriched	negative regulation of growth(3)	8	1.390320	0.007702
enriched	peripheral nervous system development(5)	5	0.441159	0.007793
enriched	cardiac muscle tissue development(5)	7	1.036050	0.007849
enriched	cartilage development(5)	7	1.062790	0.008658
enriched	programmed necrotic cell death(6)	4	0.240632	0.008658
enriched	regulation of mesenchymal cell proliferation(6)	4	0.240632	0.008658
enriched	toll like receptor 5 signaling pathway(8)	5	0.454527	0.008658
enriched	regulation of cellular response to growth factor stimulus(4)	8	1.450480	0.009252
enriched	negative regulation of protein serine threonine kinase activity(8)	6	0.748633	0.009257
enriched	negative regulation of cell migration(5)	7	1.089530	0.009616
enriched	peptidyl threonine phosphorylation(8)	5	0.474580	0.009616
enriched	negative regulation of nervous system development(4)	8	1.477210	0.009901
enriched	germinal center formation(4)	3	0.100263	0.010314
enriched	negative regulation of DNA recombination(6)	3	0.100263	0.010314
enriched	regulation of leukocyte migration(4)	6	0.775370	0.010314
enriched	negative regulation of stem cell differentiation(5)	4	0.260685	0.010318
enriched	regulation of smooth muscle cell migration(6)	4	0.260685	0.010318
enriched	meiotic mismatch repair(4)	2	0.020053	0.010421
enriched	endothelial cell apoptotic process(9)	4	0.267369	0.010765
enriched	necrotic cell death(5)	4	0.267369	0.010765
enriched	peptidyl threonine modification(8)	5	0.501317	0.010765
enriched	renal tubule morphogenesis(6)	5	0.501317	0.010765
enriched	negative regulation of cell aging(4)	3	0.106948	0.010869
enriched	negative regulation of cell motility(4)	7	1.143000	0.010869
enriched	nephron development(4)	6	0.802107	0.010869
enriched	sensory organ morphogenesis(5)	8	1.537370	0.010869
enriched	response to UV(6)	6	0.808791	0.011170
enriched	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator(7)	4	0.280737	0.011653
enriched	modification by host of symbiont morphology or physiology(5)	4	0.280737	0.011653
enriched	oligodendrocyte differentiation(6)	5	0.521369	0.011653
enriched	toll like receptor 2 signaling pathway(8)	5	0.521369	0.011653

enriched	negative regulation of nucleoside metabolic process(6)&negative regulation of ATP metabolic process(7)	3	0.113632	0.012259
enriched	cell differentiation involved in kidney development(5)	4	0.287422	0.012365
enriched	mesenchymal cell proliferation(5)	4	0.287422	0.012365
enriched	retina development in camera type eye(4)	6	0.842212	0.012737
enriched	hematopoietic progenitor cell differentiation(6)	6	0.848896	0.012835
enriched	interaction with symbiont(4)	4	0.294106	0.012835
enriched	lipopolysaccharide mediated signaling pathway(6)	4	0.294106	0.012835
enriched	regulation of cell matrix adhesion(6)	5	0.541422	0.012835
enriched	positive regulation of lipid catabolic process(5)	3	0.120316	0.013444
enriched	mammary gland development(5)	6	0.862265	0.013598
enriched	cardiac ventricle development(5)	5	0.554790	0.013752
enriched	positive regulation of leukocyte migration(4)	5	0.554790	0.013752
enriched	neural precursor cell proliferation(4)	6	0.875633	0.014346
enriched	leukocyte apoptotic process(8)	5	0.574843	0.015173
enriched	negative regulation of cell adhesion(4)	7	1.263320	0.015173
enriched	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia(7)	2	0.026737	0.015173
enriched	positive regulation of developmental growth(4)	6	0.895686	0.015173
enriched	prostate gland development(4)	4	0.314158	0.015173
enriched	regulation of G1 S transition of mitotic cell cycle(7)	6	0.895686	0.015173
enriched	striated muscle cell proliferation(5)	4	0.314158	0.015173
enriched	immunoglobulin mediated immune response(7)	5	0.581527	0.015735
enriched	cardiac chamber morphogenesis(4)	5	0.588211	0.015737
enriched	digestive system development(5)	6	0.909054	0.015737
enriched	digestive tract morphogenesis(5)	4	0.320843	0.015737
enriched	nephron tubule development(6)	5	0.588211	0.015737
enriched	phosphatidylinositol 3 kinase signaling(8)	5	0.588211	0.015737
enriched	regulation of stem cell proliferation(5)	5	0.588211	0.015737
enriched	heart morphogenesis(5)	7	1.303420	0.016908
enriched	B cell mediated immunity(6)	5	0.601580	0.017174
enriched	modulation by host of symbiont transcription(6)&modulation by host of viral transcription(7)	3	0.140369	0.017347
enriched	negative regulation of neural precursor cell proliferation(5)	3	0.140369	0.017347
enriched	positive regulation of positive chemotaxis(5)	3	0.140369	0.017347
enriched	regulation of execution phase of apoptosis(5)	3	0.140369	0.017347
enriched	artery morphogenesis(5)	4	0.340895	0.017978
enriched	positive regulation of epithelial cell proliferation(5)	6	0.949159	0.018068
enriched	ureteric bud development(6)	5	0.614948	0.018068
enriched	connective tissue development(5)	7	1.343530	0.018334
enriched	in utero embryonic development(7)	9	2.232530	0.018334
enriched	mesonephric tubule development(5)&mesonephric epithelium development(6)	5	0.621633	0.018334
enriched	regulation of cell cycle G1 S phase transition(7)	6	0.955844	0.018334
enriched	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors(7)	4	0.347580	0.018334
enriched	modulation of transcription in other organism involved in symbiotic interaction(5)	3	0.147053	0.018475
enriched	regulation of positive chemotaxis(5)	3	0.147053	0.018475
enriched	negative regulation of ion transport(4)	5	0.628317	0.018634
enriched	endothelial cell development(6)	4	0.354264	0.019141
enriched	lung vasculature development(5)	2	0.033421	0.019243
enriched	positive regulation of helicase activity(6)	2	0.033421	0.019243
enriched	mesonephros development(5)	5	0.641685	0.019789
enriched	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway(6)	6	0.982581	0.019789
enriched	positive regulation of nuclear division(5)	4	0.360948	0.019827

enriched	regulation of myeloid cell apoptotic process(7)	3	0.153737	0.019935
enriched	myelination(6)	5	0.655054	0.021294
enriched	positive regulation of osteoblast differentiation(5)	4	0.374316	0.022311
enriched	regulation of B cell activation(6)	5	0.668422	0.023033
enriched	heart growth(5)	4	0.381001	0.023379
enriched	regulation of vasoconstriction(6)	4	0.381001	0.023379
enriched	ensheathment of neurons(4)&axon ensheathment(5)	5	0.675106	0.023450
enriched	positive regulation of lymphocyte proliferation(6)	5	0.675106	0.023450
enriched	female sex differentiation(5)	5	0.681791	0.023833
enriched	multicellular organismal aging(5)	3	0.167106	0.023833
enriched	positive regulation of mononuclear cell proliferation(6)	5	0.681791	0.023833
enriched	regulation of Notch signaling pathway(5)	4	0.387685	0.023833
enriched	regulation of necrotic cell death(5)	3	0.167106	0.023833
enriched	skeletal muscle organ development(6)	6	1.042740	0.024313
enriched	positive regulation of axon guidance(5)&positive regulation of axon extension involved in axon guidance(6)	2	0.040105	0.025216
enriched	regulation of vascular smooth muscle contraction(7)	2	0.040105	0.025216
enriched	negative regulation of blood circulation(4)	3	0.173790	0.025559
enriched	positive regulation of cartilage development(4)	3	0.173790	0.025559
enriched	regulation of thymocyte aggregation(5)®ulation of T cell differentiation in thymus(6)	3	0.173790	0.025559
enriched	androgen receptor signaling pathway(7)	4	0.401053	0.025599
enriched	lymphocyte apoptotic process(9)	4	0.401053	0.025599
enriched	positive regulation of leukocyte proliferation(5)	5	0.701843	0.025599
enriched	stem cell development(5)	6	1.069480	0.026229
enriched	histone deacetylation(5)	4	0.407737	0.026446
enriched	positive regulation of neuron death(5)	4	0.407737	0.026446
enriched	regulation of mitochondrial membrane permeability(5)	4	0.407737	0.026446
enriched	regulation of ossification(4)	6	1.076160	0.026446
enriched	B cell homeostasis(5)	3	0.180474	0.026595
enriched	cardiac chamber development(4)	5	0.715212	0.026595
enriched	myeloid cell apoptotic process(8)	3	0.180474	0.026595
enriched	negative regulation of cell matrix adhesion(6)	3	0.180474	0.026595
enriched	regulation of Ras protein signal transduction(7)	6	1.089530	0.027225
enriched	regulation of stem cell differentiation(5)	5	0.721896	0.027225
enriched	cell fate commitment(5)	7	1.510630	0.027572
enriched	positive regulation of chromosome organization(6)	5	0.728580	0.028018
enriched	epidermis morphogenesis(6)	3	0.187158	0.028632
enriched	mismatch repair(5)	3	0.187158	0.028632
enriched	regulation of epithelial cell differentiation(5)	5	0.735264	0.028704
enriched	positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal(7)	6	1.109580	0.028932
enriched	neural nucleus development(4)	4	0.427790	0.029232
enriched	positive regulation of B cell activation(6)	4	0.427790	0.029232
enriched	response to mechanical stimulus(4)	6	1.116260	0.029356
enriched	positive regulation of histone phosphorylation(6)	2	0.046790	0.029771
enriched	retinal cell programmed cell death(6)	2	0.046790	0.029771
enriched	positive regulation of Notch signaling pathway(5)	3	0.193842	0.029911
enriched	positive regulation of cell division(4)	5	0.748633	0.029911
enriched	regulation of membrane permeability(4)	4	0.434474	0.029911
enriched	vasculogenesis(5)	4	0.434474	0.029911
enriched	positive regulation of NF kappaB transcription factor activity(6)	5	0.755317	0.030509
enriched	positive regulation of mesenchymal cell proliferation(6)	3	0.200527	0.032725
enriched	negative regulation of MAP kinase activity(7)	4	0.447843	0.032728
enriched	toll like receptor 10 signaling pathway(8)	4	0.447843	0.032728
enriched	glial cell development(5)	4	0.454527	0.034417
enriched	cell matrix adhesion(5)	6	1.169740	0.034946
enriched	prostate gland morphogenesis(4)	3	0.207211	0.034946
enriched	regulation of peptidyl threonine phosphorylation(8)	3	0.207211	0.034946
enriched	adherens junction assembly(6)	4	0.461211	0.035427
enriched	regulation of leukocyte apoptotic process(7)	4	0.461211	0.035427

enriched	CD8 positive alpha beta T cell differentiation(8)	2	0.053474	0.035982
enriched	granulocyte macrophage colony stimulating factor production(5)®ulation of granulocyte macrophage colony stimulating factor production(5)	2	0.053474	0.035982
enriched	positive regulation of granulocyte macrophage colony stimulating factor production(5)	2	0.053474	0.035982
enriched	regulation of helicase activity(6)	2	0.053474	0.035982
enriched	regulation of organ growth(4)	4	0.467895	0.036458
enriched	regulation of cell aging(4)	3	0.213895	0.036863
enriched	Notch signaling pathway(6)	6	1.203160	0.037799
enriched	positive regulation of stress activated MAPK cascade(7)	5	0.808791	0.037799
enriched	protein deacetylation(8)	4	0.474580	0.037799
enriched	regulation of neural precursor cell proliferation(5)	4	0.474580	0.037799
enriched	alpha beta T cell differentiation(7)	4	0.481264	0.038102
enriched	epithelial cell differentiation involved in kidney development(5)	3	0.220579	0.038102
enriched	patterning of blood vessels(5)	3	0.220579	0.038102
enriched	positive regulation of B cell proliferation(7)	3	0.220579	0.038102
enriched	positive regulation of stress activated protein kinase signaling cascade(6)	5	0.815475	0.038102
enriched	regulation of protein stability(4)	6	1.209840	0.038102
enriched	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia(6)	3	0.220579	0.038102
enriched	vasoconstriction(7)	4	0.481264	0.038102
enriched	positive regulation of histone modification(5)	4	0.487948	0.039495
enriched	positive regulation of proteasomal ubiquitin dependent protein catabolic process(8)	4	0.487948	0.039495
enriched	toll like receptor TLR1 TLR2 signaling pathway(8)&toll like receptor TLR6 TLR2 signaling pathway(8)	4	0.487948	0.039495
enriched	digestive tract development(4)	5	0.835528	0.040539
enriched	inflammatory response to antigenic stimulus(4)	3	0.227264	0.040539
enriched	myeloid leukocyte migration(4)	5	0.835528	0.040539
enriched	stem cell division(5)	3	0.227264	0.040539
enriched	negative regulation of organic acid transport(4)	2	0.060158	0.040606
enriched	positive regulation of chemokine biosynthetic process(6)	2	0.060158	0.040606
enriched	positive regulation of execution phase of apoptosis(5)	2	0.060158	0.040606
enriched	positive regulation of fatty acid beta oxidation(6)	2	0.060158	0.040606
enriched	regulation of JUN kinase activity(8)	4	0.494632	0.040606
enriched	regulation of cyclin dependent protein serine threonine kinase activity involved in G1 S transition of mitotic cell cycle(6)	2	0.060158	0.040606
enriched	toll like receptor 9 signaling pathway(8)	4	0.501317	0.041561
enriched	activin receptor signaling pathway(8)	3	0.233948	0.041770
enriched	negative regulation of multi organism process(3)	5	0.848896	0.041770
enriched	negative regulation of reactive oxygen species metabolic process(5)	3	0.233948	0.041770
enriched	ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis(6)	3	0.233948	0.041770
enriched	negative regulation of MAPK cascade(6)	5	0.855580	0.042174
enriched	positive regulation of chromatin modification(7)	4	0.508001	0.042174
enriched	positive regulation of ossification(4)	4	0.508001	0.042174
enriched	protein deacylation(7)	4	0.508001	0.042174
enriched	developmental maturation(4)	6	1.270000	0.043305
enriched	macromolecule deacylation(6)	4	0.514685	0.043889
enriched	regulation of endothelial cell apoptotic process(8)	3	0.240632	0.044025
enriched	autonomic nervous system development(5)	3	0.247316	0.044857
enriched	cardiac muscle cell proliferation(5)	3	0.247316	0.044857
enriched	diaphragm development(6)	2	0.066842	0.044857
enriched	establishment of endothelial barrier(7)	3	0.247316	0.044857
enriched	female gamete generation(5)	4	0.528053	0.044857

enriched	negative regulation of small GTPase mediated signal transduction(6)	3	0.254000	0.046833
enriched	regulation of heart growth(5)	3	0.254000	0.046833
enriched	placenta development(4)	5	0.902370	0.047643
enriched	MyD88 dependent toll like receptor signaling pathway(8)	4	0.548106	0.048772
enriched	regulation of DNA binding(5)	4	0.548106	0.048772
enriched	regulation of generation of precursor metabolites and energy(5)	4	0.548106	0.048772
enriched	regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production(5)	4	0.548106	0.048772
enriched	smooth muscle cell proliferation(5)	4	0.548106	0.048772
enriched	tube formation(4)	5	0.909054	0.048772
enriched	protein insertion into membrane(5)	3	0.260685	0.049006
enriched	histone H4 deacetylation(6)	2	0.066842	0.044857
enriched	negative regulation of Ras protein signal transduction(7)	3	0.247316	0.044857
enriched	negative regulation of cellular senescence(4)	2	0.066842	0.044857
enriched	negative regulation of glycolytic process(6)	2	0.066842	0.044857
enriched	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress(7)	2	0.066842	0.044857
enriched	palate development(4)	4	0.521369	0.044857
enriched	protein K11 linked deubiquitination(8)	2	0.066842	0.044857
enriched	regulation of histone phosphorylation(6)	2	0.066842	0.044857
enriched	regulation of immature T cell proliferation(8)	2	0.066842	0.044857
enriched	regulation of lipid transport(5)	4	0.521369	0.044857
enriched	regulation of tumor necrosis factor production(6)	4	0.528053	0.044857
enriched	response to peptidoglycan(5)	2	0.066842	0.044857
enriched	regulation of cytokine biosynthetic process(5)	4	0.534738	0.046437
enriched	regulation of smooth muscle cell proliferation(5)	4	0.534738	0.046437
enriched	tumor necrosis factor production(6)	4	0.534738	0.046437
enriched	developmental programmed cell death(5)	3	0.254000	0.046833
enriched	isotype switching(4)&somatic diversification of immunoglobulins involved in immune response(5)&somatic recombination of immunoglobulin genes involved in immune response(6)	3	0.254000	0.046833

GO_- Molecular Function

Type	Name	#Hits	Expected score	p-Value
enriched	transcription factor activity RNA polymerase II core promoter proximal region sequence specific binding(5)	13	1.978530	0.000116
enriched	transcriptional activator activity RNA polymerase II core promoter proximal region sequence specific binding(6)	10	1.356900	0.000710
enriched	transcriptional activator activity RNA polymerase II transcription regulatory region sequence specific binding(5)	11	1.871580	0.001225
enriched	transcriptional repressor activity RNA polymerase II transcription regulatory region sequence specific binding(5)	7	0.942475	0.015375
enriched	androgen receptor binding(8)	4	0.247316	0.016862
enriched	cytokine binding(4)	5	0.474580	0.016862
enriched	growth factor binding(4)	6	0.708527	0.016862
enriched	guanine thymine mispair binding(8)	2	0.020053	0.016862
enriched	interleukin 1 receptor binding(6)	3	0.100263	0.016862
enriched	single guanine insertion binding(10)	2	0.020053	0.016862
enriched	steroid hormone receptor binding(7)	5	0.481264	0.016862
enriched	transforming growth factor beta receptor binding(6)	4	0.280737	0.019876
enriched	transmembrane receptor protein serine threonine kinase activity(7)	3	0.113632	0.019876
enriched	MutLalpha complex binding(6)	2	0.026737	0.023085
enriched	oxidized DNA binding(7)&oxidized purine DNA binding(8)	2	0.026737	0.023085
enriched	single base insertion or deletion binding(9)	2	0.026737	0.023085
enriched	core promoter proximal region DNA binding(8)	9	2.165690	0.024651
enriched	core promoter proximal region sequence specific DNA binding(9)	9	2.152320	0.024651
enriched	transcriptional repressor activity RNA polymerase II core promoter proximal region sequence specific binding(6)	5	0.648369	0.035304
enriched	DNA insertion or deletion binding(8)	2	0.040105	0.043588
enriched	receptor signaling protein serine threonine kinase activity(5)	4	0.394369	0.043588
enriched	RNA polymerase II repressing transcription factor binding(6)	3	0.180474	0.048128
enriched	ADP binding(5)	3	0.193842	0.048517
enriched	BMP binding(5)	2	0.046790	0.048517
enriched	growth factor receptor binding(5)	5	0.748633	0.048517
enriched	mismatch repair complex binding(5)	2	0.046790	0.048517
enriched	p53 binding(4)	4	0.421106	0.048517

KEGG_- Pathways

Type	Name	#Hits	Expected score	p-Value
enriched	MicroRNAs in cancer	18	1.042740	0.000000
enriched	Pathways in cancer	15	2.072110	0.000000
enriched	Apoptosis	8	0.501317	0.000003
enriched	MAPK signaling pathway	12	1.577480	0.000004
enriched	HIF-1 signaling pathway	8	0.655054	0.000013
enriched	Pancreatic cancer	7	0.434474	0.000013
enriched	Cytokine-cytokine receptor interaction	10	1.316790	0.000028
enriched	Measles	8	0.748633	0.000028

enriched	FoxO signaling pathway	8	0.815475	0.000039
enriched	Prostate cancer	7	0.561475	0.000039
enriched	Proteoglycans in cancer	10	1.410370	0.000039
enriched	Hepatitis B	8	0.875633	0.000061
enriched	TNF signaling pathway	7	0.675106	0.000105
enriched	Toxoplasmosis	7	0.681791	0.000105
enriched	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	5	0.307474	0.000247
enriched	NF-kappa B signaling pathway	6	0.528053	0.000250
enriched	Small cell lung cancer	6	0.534738	0.000253
enriched	Focal adhesion	8	1.243270	0.000533
enriched	African trypanosomiasis	4	0.193842	0.000576
enriched	Chagas disease (American trypanosomiasis)	6	0.641685	0.000609
enriched	Colorectal cancer	5	0.407737	0.000676
enriched	Influenza A	7	0.969212	0.000676
enriched	Ras signaling pathway	8	1.356900	0.000775
enriched	Glioma	5	0.427790	0.000782
enriched	Melanoma	5	0.441159	0.000870
enriched	Bladder cancer	4	0.254000	0.001250
enriched	Transcriptional misregulation in cancer	7	1.109580	0.001268
enriched	TGF-beta signaling pathway	5	0.501317	0.001431
enriched	Epstein-Barr virus infection	7	1.203160	0.001948
enriched	Rap1 signaling pathway	7	1.236580	0.002228
enriched	Toll-like receptor signaling pathway	5	0.581527	0.002598
enriched	Endometrial cancer	4	0.334211	0.002979
enriched	Non-small cell lung cancer	4	0.360948	0.003854
enriched	Tuberculosis	6	0.989265	0.003854
enriched	PI3K-Akt signaling pathway	8	1.965160	0.006269
enriched	Neurotrophin signaling pathway	5	0.748633	0.007016
enriched	p53 signaling pathway	4	0.434474	0.007016
enriched	Adherens junction	4	0.454527	0.008093
enriched	Rheumatoid arthritis	4	0.487948	0.010274
enriched	Malaria	3	0.247316	0.013314
enriched	Hippo signaling pathway	5	1.002630	0.022610
enriched	Herpes simplex infection	5	1.022690	0.024023
enriched	Chemokine signaling pathway	5	1.056110	0.026904
enriched	Legionellosis	3	0.354264	0.033783
enriched	Hepatitis C	4	0.721896	0.036714
enriched	mTOR signaling pathway	3	0.381001	0.039594
enriched	Leishmaniasis	3	0.394369	0.042643
enriched	Jak-STAT signaling pathway	4	0.768685	0.042859
enriched	Endocytosis	5	1.236580	0.045573
enriched	Adipocytokine signaling pathway	3	0.421106	0.047093
enriched	Mismatch repair	2	0.140369	0.047093
enriched	Pertussis	3	0.427790	0.048227
enriched	Renal cell carcinoma	3	0.434474	0.049370

WikiPathways

Type	Name	#Hits	Expected score	p-Value
enriched	Integrated Breast Cancer Pathway	15	0.989265	0.000000
enriched	Integrated Pancreatic Cancer Pathway	12	1.229900	0.000000
enriched	Signaling Pathways in Glioblastoma	9	0.528053	0.000000
enriched	Androgen receptor signaling pathway	9	0.588211	0.000000
enriched	EGF/EGFR Signaling Pathway	11	1.036050	0.000000
enriched	MAPK Signaling Pathway	11	1.049420	0.000000
enriched	Focal Adhesion	10	1.116260	0.000007
enriched	Integrated Cancer Pathway	6	0.287422	0.000012
enriched	Spinal Cord Injury	8	0.675106	0.000012
enriched	Apoptosis Modulation and Signaling	7	0.574843	0.000048
enriched	Endochondral Ossification	6	0.387685	0.000056
enriched	TGF-beta Signaling Pathway	8	0.855580	0.000056
enriched	Senescence and Autophagy in Cancer	7	0.688475	0.000124
enriched	Mecp2 and Associated Rett Syndrome	5	0.294106	0.000217
enriched	Apoptosis	6	0.514685	0.000223
enriched	IL1 and megakaryocytes in obesity	4	0.147053	0.000223
enriched	TGF-beta Receptor Signaling	5	0.354264	0.000450
enriched	Extracellular vesicle-mediated signaling in recipient cells	4	0.187158	0.000538
enriched	Bladder Cancer	4	0.207211	0.000772
enriched	Rac1/Pak1/p38/MMP-2 pathway	5	0.421106	0.000888
enriched	DNA Damage Response (only ATM dependent)	6	0.715212	0.001040
enriched	Estrogen Receptor Pathway	3	0.086895	0.001040
enriched	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	4	0.240632	0.001163
enriched	FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	4	0.267369	0.001648
enriched	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	6	0.795422	0.001648
enriched	NOTCH1 regulation of human endothelial cell calcification	3	0.106948	0.001669
enriched	Vitamin B12 Metabolism	4	0.280737	0.001826
enriched	Interleukin-11 Signaling Pathway	4	0.294106	0.002114
enriched	Toll-like Receptor Signaling Pathway	5	0.568159	0.002545
enriched	IL-1 signaling pathway	4	0.360948	0.004094

enriched	Interferon type I signaling pathways	4	0.360948	0.004094
enriched	TCA Cycle Nutrient Utilization and Invasiveness of Ovarian Cancer	2	0.033421	0.004094
enriched	Folate Metabolism	4	0.381001	0.004884
enriched	T-Cell Receptor and Co-stimulatory Signaling	3	0.180474	0.006321
enriched	AGE/RAGE pathway	4	0.427790	0.006948
enriched	Oncostatin M Signaling Pathway	4	0.427790	0.006948
enriched	DNA Damage Response	4	0.434474	0.006979
enriched	TSH signaling pathway	4	0.434474	0.006979
enriched	Selenium Micronutrient Network	4	0.447843	0.007620
enriched	Adipogenesis	5	0.775370	0.007662
enriched	miRNA Regulation of DNA Damage Response	4	0.454527	0.007662
enriched	TFs Regulate miRNAs related to cardiac hypertrophy	2	0.053474	0.008186
enriched	Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor	3	0.220579	0.009057
enriched	Leptin signaling pathway	4	0.494632	0.009781
enriched	Mismatch repair	2	0.060158	0.009781
enriched	MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	4	0.534738	0.012478
enriched	BDNF signaling pathway	5	0.902370	0.012770
enriched	PDGF Pathway	3	0.260685	0.013202
enriched	Cell Differentiation - Index	2	0.073526	0.013604
enriched	SIDS Susceptibility Pathways	5	0.955844	0.015418
enriched	Aryl Hydrocarbon Receptor	3	0.287422	0.016458
enriched	Heart Development	3	0.294106	0.017239
enriched	Copper homeostasis	3	0.300790	0.018035
enriched	Structural Pathway of Interleukin 1 (IL-1)	3	0.307474	0.018845
enriched	miRNAs involved in DNA damage response	2	0.106948	0.025874
enriched	Apoptosis Modulation by HSP70	2	0.113632	0.028172
enriched	Overview of nanoparticle effects	2	0.113632	0.028172
enriched	TP53 Network	2	0.127000	0.034511
enriched	EBV LMP1 signaling	2	0.133684	0.037532
enriched	Allograft Rejection	3	0.441159	0.046199
enriched	Angiogenesis	2	0.153737	0.046199
enriched	Estrogen signaling pathway	2	0.153737	0.046199
enriched	Physiological and Pathological Hypertrophy of the Heart	2	0.153737	0.046199

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. March WA, Moore VM, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010;25(2):544-51.
 2. Lauritsen MP, Bentzen JG, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 2014;29(4):791-801.
 3. Lizneva D, Suturina L, et al. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2016;106(1):6-15.
 4. Azziz R, Sanchez LA, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):453-62.
 5. Yildiz BO, Bozdag G, et al. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2012;27(10):3067-73.
 6. Hayes MG, Urbanek M, et al. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat Commun.* 2015;6:7502.
 7. Azziz R. Introduction: Determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2016;106(1):4-5.
 8. Ilie IR, Georgescu CE. Polycystic Ovary Syndrome-Epigenetic Mechanisms and Aberrant MicroRNA. *Adv Clin Chem.* 2015;71:25-45.
 9. Xu N, Azziz R, et al. Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. *Fertil Steril.* 2010;94(2):781-3 e1.
 10. Li S, Zhu D, et al. Differential DNA methylation patterns of polycystic ovarian syndrome in whole blood of Chinese women. *Oncotarget.* 2016.
 11. Teede HJ, Misso ML, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2018.
-

12. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2005;352(12):1223-36.
 13. Maffazioli GDN, Lopes CP, et al. Prevalence of metabolic disturbances among women with polycystic ovary syndrome in different regions of Brazil. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020;151(3):383-91.
 14. Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 2002;77(6):1095-105.
 15. Unluturk U, Sezgin E, et al. Evolutionary determinants of polycystic ovary syndrome: part 1. *Fertil Steril*. 2016;106(1):33-41.
 16. Chen ZJ, Zhao H, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet*. 2011;43(1):55-9.
 17. Shi Y, Zhao H, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet*. 2012;44(9):1020-5.
 18. Lerchbaum E, Trummer O, et al. Susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21, and 9q33.3 in a cohort of Caucasian women. *Horm Metab Res*. 2011;43(11):743-7.
 19. Goodarzi MO, Jones MR, et al. Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *J Med Genet*. 2012;49(2):90-5.
 20. Welt CK, Styrkarsdottir U, et al. Variants in DENND1A are associated with polycystic ovary syndrome in women of European ancestry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(7):E1342-7.
 21. Lee H, Oh JY, et al. Genome-wide association study identified new susceptibility loci for polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2015;30(3):723-31.
 22. Zeggini E, Scott LJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008;40(5):638-45.
-

23. Voight BF, Scott LJ, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010;42(7):579-89.
 24. Notelovitz M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril.* 2002;77 Suppl 4:S34-41.
 25. Soeters MR, Soeters PB. The evolutionary benefit of insulin resistance. *Clin Nutr.* 2012;31(6):1002-7.
 26. Vallisneri A. *Istoria della Generazione dell' Uomo, degli Animali, se Sia da' Vermicelli Spermatici, o dalle uova.* . Venezia (Italy): Apresso Gio Gabbriel Hertz. 1971:146.
 27. Chereau A. *Memories pour Servir a l'Etude des Maladies des Ovaries* Paris: Fortin, Masson & Cie. 1844.
 28. Rokitansky C. *A Manual of Pathological Anatomy.* Philadelphia: Blanchard & Lea. 1855;2:246.
 29. Stein IF, Leventhal MM. Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-91.
 30. Jones GE, Howard JE, et al. The use of cortisone in follicular phase disturbances. *Fertil Steril.* 1953;4(1):49-62.
 31. Mc AJ, Ingersoll FM, et al. The urinary excretion of interstitial-cell and follicle-stimulating hormone activity by women with diseases of the reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1958;18(11):1202-15.
 32. Yen SS, Vela P, et al. Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1970;30(4):435-42.
 33. Szydlarska D, Grzesiuk W, et al. Evolution of polycystic ovary syndrome. *Ginekologia i Poloznictwo Medical Project.* 2010;4:63-8.
 34. Moran L, Teede H. Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2009;15(4):477-88.
-

-
35. K ZJ, Dunaif A. Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: towards a rational approach. Blackwell and Scientific Publications. 1992:377-84.
36. Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):19-25.
37. Azziz R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(3):781-5.
38. Azziz R, Carmina E, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4237-45.
39. Azziz R, Carmina E, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-88.
40. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(13):853-61.
41. Ingersoll FM, Mc AJ. Longitudinal studies of gonadotropin excretion in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1959;77(4):795-805.
42. Taymor ML, Barnard R. Luteinizing hormone excretion in the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1962;13:501-12.
43. Balen AH. Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1993;8 Suppl 2:123-8.
44. Simoni M, Tempfer CB, et al. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update*. 2008;14(5):459-84.
45. Day FR, Hinds DA, et al. Causal mechanisms and balancing selection inferred from genetic associations with polycystic ovary syndrome. *Nat Commun*. 2015;6:8464.
46. Zhu YN, Zhang YT, et al. Association analysis between the tag single nucleotide polymorphisms of DENND1A and the risk of polycystic ovary syndrome in Chinese Han women. *BMC Med Genet*. 2020;21(1):14.
-

-
47. Lockwood GM, Muttukrishna S, et al. Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1730-5.
48. Laven JS, Imani B, et al. Absent biologically relevant associations between serum inhibin B concentrations and characteristics of polycystic ovary syndrome in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod.* 2001;16(7):1359-64.
49. Cimino I, Casoni F, et al. Novel role for anti-Mullerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun.* 2016;7:10055.
50. McAllister JM, Legro RS, et al. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(3):118-24.
51. Tata B, Mimouni NEH, et al. Elevated prenatal anti-Mullerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med.* 2018;24(6):834-46.
52. Zhou R, Bird IM, et al. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6630-7.
53. Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(5):1660-6.
54. Abbott DH, Barnett DK, et al. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):357-74.
55. Adams JM, Taylor AE, et al. Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4343-50.
56. Willis D, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(12):3788-90.
-

-
57. Willis D, Mason H, et al. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(1):302-9.
58. Nelson VL, Qin KN, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5925-33.
59. Nestler JE, Jakubowicz DJ. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1996;335(9):617-23.
60. Rosenfield RL, Barnes RB, et al. Dysregulation of cytochrome P450c 17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril*. 1990;53(5):785-91.
61. McAllister JM, Modi B, et al. Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(15):E1519-27.
62. Erickson GF, Magoffin DA, et al. Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum Reprod*. 1992;7(3):293-9.
63. Seifer DB, Maclaughlin DT. Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance. *Fertil Steril*. 2007;88(3):539-46.
64. Pellatt L, Hanna L, et al. Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):240-5.
65. Visser JA, de Jong FH, et al. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006;131(1):1-9.
66. Garg D, Tal R. The role of AMH in the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(1):15-28.
67. Maciel GA, Baracat EC, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5321-7.
68. Judd HL, Rigg LA, et al. The effects of ovarian wedge resection on circulating gonadotropin and ovarian steroid levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976;43(2):347-55.
-

-
69. Webber LJ, Stubbs S, et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*. 2003;362(9389):1017-21.
70. Yildiz BO, Azziz R. The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(4):331-42.
71. Burghen GA, Givens JR, et al. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;50(1):113-6.
72. Dunaif A, Hoffman AR, et al. Clinical, biochemical, and ovarian morphologic features in women with acanthosis nigricans and masculinization. *Obstet Gynecol*. 1985;66(4):545-52.
73. Flier JS, Eastman RC, et al. Acanthosis nigricans in obese women with hyperandrogenism. Characterization of an insulin-resistant state distinct from the type A and B syndromes. *Diabetes*. 1985;34(2):101-7.
74. Dunaif A. Hyperandrogenemia is necessary but not sufficient for polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003;80(2):262-3.
75. Carmina E, Koyama T, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(6):1807-12.
76. Dunaif A, Segal KR, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1989;38(9):1165-74.
77. Legro RS, Kusanman AR, et al. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):165-9.
78. Zhu S, Zhang B, et al. Metabolic disturbances in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2019;111(1):168-77.
79. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med*. 1991;325(13):938-48.
-

-
80. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med*. 1985;36:429-51.
81. Bonadonna RC, Groop L, et al. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism*. 1990;39(5):452-9.
82. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999;274(4):1865-8.
83. Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):22-4.
84. Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, et al. Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol*. 2005;19(2):379-90.
85. Brower MA, Jones MR, et al. Further investigation in europeans of susceptibility variants for polycystic ovary syndrome discovered in genome-wide association studies of Chinese individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):E182-6.
86. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of H, Mit LU, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007;316(5829):1331-6.
87. Weedon MN, Lettre G, et al. A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population. *Nat Genet*. 2007;39(10):1245-50.
88. Rosenbaum D, Haber RS, et al. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol*. 1993;264(2 Pt 1):E197-202.
89. Ciaraldi TP, Aroda V, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with tissue-specific differences in insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):157-63.
90. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(9):3110-6.
-

-
91. Wu XK, Zhou SY, et al. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003;80(4):954-65.
92. Li T, Mo H, et al. Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci*. 2017;24(5):646-55.
93. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012;33(6):981-1030.
94. Nestler JE, Powers LP, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72(1):83-9.
95. Oberfield SE. Metabolic lessons from the study of young adolescents with polycystic ovary syndrome--is insulin, indeed, the culprit? *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(10):3520-5.
96. De Leo V, la Marca A, et al. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2003;24(5):633-67.
97. Ehrmann DA, Barnes RB, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*. 1999;22(1):141-6.
98. Lin TC, Yen JM, et al. Abnormal glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovary syndrome amongst the Taiwanese population- not correlated with insulin receptor substrate-1 Gly972Arg/Ala513Pro polymorphism. *BMC Med Genet*. 2006;7:36.
99. Palmert MR, Gordon CM, et al. Screening for abnormal glucose tolerance in adolescents with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1017-23.
100. Graf MJ, Richards CJ, et al. The independent effects of hyperandrogenaemia, hyperinsulinaemia, and obesity on lipid and lipoprotein profiles in women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1990;33(1):119-31.
101. Robinson S, Henderson AD, et al. Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;44(3):277-84.
-

-
102. Wild RA, Painter PC, et al. Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61(5):946-51.
103. Legro RS, Kunselman AR, et al. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med.* 2001;111(8):607-13.
104. McAuley KA, Williams SM, et al. Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care.* 2001;24(3):460-4.
105. Lindheim SR, Buchanan TA, et al. Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *J Soc Gynecol Investig.* 1994;1(2):150-4.
106. Legro RS, Finegood D, et al. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(8):2694-8.
107. Unwin N, Shaw J, et al. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med.* 2002;19(9):708-23.
108. Matthews DR, Hosker JP, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
109. Katz A, Nambi SS, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2402-10.
110. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1999;22(9):1462-70.
111. Muniyappa R, Lee S, et al. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(1):E15-26.
112. Bartoli E, Fra GP, et al. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur J Intern Med.* 2011;22(1):8-12.
-

113. Gerstein HC, Santaguida P, et al. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78(3):305-12.
114. Cassar S, Misso ML, et al. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp studies. *Hum Reprod.* 2016;31(11):2619-31.
115. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173(1):20-51.
116. Karolina DS, Tavintharan S, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):E2271-6.
117. Dehwah MA, Xu A, et al. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *J Genet Genomics.* 2012;39(1):11-8.
118. Lee RC, Feinbaum RL, et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
119. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
120. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 2007;23(5):243-9.
121. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350-5.
122. Vasudevan S, Tong Y, et al. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-4.
123. Zhang X, Zuo X, et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell.* 2014;158(3):607-19.
124. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11(7):537-61.
-

-
125. Lewis BP, Burge CB, et al. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
126. Zhao Y, He S, et al. MicroRNA regulation of messenger-like noncoding RNAs: a network of mutual microRNA control. *Trends Genet*. 2008;24(7):323-7.
127. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205.
128. Calvano Filho CM, Calvano-Mendes DC, et al. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. *Tumour Biol*. 2014;35(8):7733-41.
129. Faccini J, Ruidavets JB, et al. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Sci Rep*. 2017;7:42916.
130. Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):1811-9.
131. Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(5):725-37; quiz 38-40.
132. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. 2014;51(4):759-74.
133. Mori MA, Ludwig RG, et al. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab*. 2019;30(4):656-73.
134. Poy MN, Eliasson L, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
135. Bandiera S, Pfeffer S, et al. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol*. 2015;62(2):448-57.
136. Thomou T, Mori MA, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.
137. Weber JA, Baxter DH, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.
-

138. Hong H, Li Y, et al. Identification of Circulating miR-125b as a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease in APP/PS1 Transgenic Mouse. *J Alzheimers Dis.* 2017;59(4):1449-58.
139. Jones A, Danielson KM, et al. miRNA Signatures of Insulin Resistance in Obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2017;25(10):1734-44.
140. Hilton C, Karpe F. Circulating microRNAs: what is their relevance? *Clin Chem.* 2013;59(5):729-31.
141. Arroyo JD, Chevillet JR, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):5003-8.
142. Vickers KC, Palmisano BT, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-33.
143. Wang K, Zhang S, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):7248-59.
144. Zerneck A, Bidzhekov K, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009;2(100):ra81.
145. Creemers EE, Tijssen AJ, et al. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110(3):483-95.
146. de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem.* 2013;46(10-11):869-78.
147. Dewailly D, Lujan ME, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update.* 2014;20(3):334-52.
148. Duijkers IJ, Klipping C. Polycystic ovaries, as defined by the 2003 Rotterdam consensus criteria, are found to be very common in young healthy women. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(3):152-60.
-

-
149. Azziz R, Kintziger K, et al. Recommendations for epidemiologic and phenotypic research in polycystic ovary syndrome: an androgen excess and PCOS society resource. *Hum Reprod*. 2019;34(11):2254-65.
150. Keevil BG. How do we measure hyperandrogenemia in patients with PCOS? *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(3):777-9.
151. Owen LJ, Keevil BG. Testosterone measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry: the importance of internal standard choice. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(Pt 6):600-2.
152. Rosner W, Auchus RJ, et al. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):405-13.
153. Maffazioli GDN, Bachega T, et al. Steroid Screening Tools Differentiating Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia and Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(8).
154. Karakas SE. New biomarkers for diagnosis and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2017;471:248-53.
155. Deswal R, Yadav A, et al. Sex hormone binding globulin - an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta-analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;64(1):12-24.
156. Daan NM, Koster MP, et al. Biomarker Profiles in Women with PCOS and PCOS Offspring; A Pilot Study. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165033.
157. Polak K, Czyzyk A, et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(1):1-8.
158. Carmina E, Campagna AM, et al. Amh Measurement Versus Ovarian Ultrasound in the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome in Different Phenotypes. *Endocr Pract*. 2016;22(3):287-93.
159. Saikumar P, Selvi VK, et al. Anti mullerian hormone: a potential marker for recruited non growing follicle of ovarian pool in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(9):1866-9.
-

-
160. Sahmay S, Atakul N, et al. Elevated serum levels of anti-Mullerian hormone can be introduced as a new diagnostic marker for polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013;92(12):1369-74.
161. Amer SA, Mahran A, et al. The influence of circulating anti-Mullerian hormone on ovarian responsiveness to ovulation induction with gonadotrophins in women with polycystic ovarian syndrome: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:115.
162. Mahran A, Abdelmeged A, et al. The predictive value of circulating anti-Mullerian hormone in women with polycystic ovarian syndrome receiving clomiphene citrate: a prospective observational study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4170-5.
163. Pankhurst MW, Chong YH, et al. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Mullerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle. *Physiol Rep*. 2016;4(9).
164. Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Mullerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(10):E1241-7.
165. Evliyaoglu O, Imohl M, et al. Age-specific reference values improve the diagnostic performance of AMH in polycystic ovary syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(8):1291-301.
166. Bentzen JG, Forman JL, et al. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(6):612-9.
167. Karakas SE, Kim K, et al. Determinants of impaired fasting glucose versus glucose intolerance in polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*. 2010;33(4):887-93.
168. Sang Q, Yao Z, et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):3068-79.
169. Roth LW, McCallie B, et al. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(3):355-62.
-

-
170. Long W, Zhao C, et al. Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(5):1304-15.
171. Jiang L, Huang J, et al. MicroRNA-93 promotes ovarian granulosa cells proliferation through targeting CDKN1A in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(5):E729-38.
172. Wu HL, Heneidi S, et al. The expression of the miR-25/93/106b family of micro-RNAs in the adipose tissue of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2754-61.
173. Deswal R, Dang AS. Dissecting the role of micro-RNAs as a diagnostic marker for polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2020;113(3):661-9 e2.
174. Arancio W, Calogero Amato M, et al. Serum miRNAs in women affected by hyperandrogenic polycystic ovary syndrome: the potential role of miR-155 as a biomarker for monitoring the estroprogestinic treatment. *Gynecol Endocrinol*. 2018:1-5.
175. Ding CF, Chen WQ, et al. Circulating microRNAs in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Fertil (Camb)*. 2015;18(1):22-9.
176. Jiang L, Huang J, et al. Identification of several circulating microRNAs from a genome-wide circulating microRNA expression profile as potential biomarkers for impaired glucose metabolism in polycystic ovarian syndrome. *Endocrine*. 2016;53(1):280-90.
177. Murri M, Insenser M, et al. Non-targeted profiling of circulating microRNAs in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): effects of obesity and sex hormones. *Metabolism*. 2018.
178. Preis SR, Massaro JM, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(11):2191-8.
179. Sathyapalan T, David R, et al. Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Sci Rep*. 2015;5:16890.
-

-
180. Chen YH, Heneidi S, et al. miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*. 2013;62(7):2278-86.
181. Sorensen AE, Wissing ML, et al. MicroRNA Species in Follicular Fluid Associating With Polycystic Ovary Syndrome and Related Intermediary Phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1579-89.
182. Naji M, Aleyasin A, et al. Differential Expression of miR-93 and miR-21 in Granulosa Cells and Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome Associating with Different Phenotypes. *Sci Rep*. 2017;7(1):14671.
183. Kloosterman WP, Lagendijk AK, et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*. 2007;5(8):e203.
184. Poy MN, Spranger M, et al. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9 Suppl 2:67-73.
185. Zhang A, Li D, et al. Islet beta cell: An endocrine cell secreting miRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(2):1648-54.
186. Calderari S, Diawara MR, et al. Biological roles of microRNAs in the control of insulin secretion and action. *Physiol Genomics*. 2017;49(1):1-10.
187. Nigi L, Grieco GE, et al. MicroRNAs as Regulators of Insulin Signaling: Research Updates and Potential Therapeutic Perspectives in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
188. Mononen N, Lyytikäinen LP, et al. Whole blood microRNA levels associate with glycemic status and correlate with target mRNAs in pathways important to type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2019;9(1):8887.
189. WHO. Waist circumference and Waist/Hip Ratio http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/. 2011.
190. Grundy SM, Cleeman JI, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.
-

-
191. Grundy SM, Cleeman JI, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004;110(2):227-39.
192. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961;21:1440-7.
193. Eden JA, Carter GD, et al. Factors influencing the free androgen index in a group of subfertile women with normal ovaries. *Ann Clin Biochem*. 1988;25 (Pt 4):350-3.
194. Eden JA, Place J, et al. Elevated free androgen index as an indicator of polycystic ovaries in oligomenorrhoea without obesity or hirsuties. *Ann Clin Biochem*. 1988;25 (Pt 4):346-9.
195. Geloneze B, Vasques AC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):281-7.
196. Motamed N, Miresmail SJ, et al. Optimal cutoff points for HOMA-IR and QUICKI in the diagnosis of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: A population based study. *J Diabetes Complications*. 2016;30(2):269-74.
197. Pontes AG, Rehme MF, et al. [Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with anthropometric and biochemical variables]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(2):74-9.
198. Amato MC, Giordano C, et al. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010;33(4):920-2.
199. Kahn HS. The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord*. 2005;5:26.
200. Lo JC, Feigenbaum SL, et al. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1357-63.
201. Amato MC, Guarnotta V, et al. Metabolically healthy polycystic ovary syndrome (MH-PCOS) and metabolically unhealthy polycystic ovary syndrome
-

(MU-PCOS): a comparative analysis of four simple methods useful for metabolic assessment. *Hum Reprod.* 2013;28(7):1919-28.

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

203. Wang K, Yuan Y, et al. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One.* 2012;7(7):e41561.

204. Hunter MP, Ismail N, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3(11):e3694.

205. Shah JS, Soon PS, et al. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153200.

206. de Almeida BC, Garcia N, et al. Oncomirs Expression Profiling in Uterine Leiomyosarcoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1).

207. Sorensen AE, Udesen PB, et al. Hyperandrogenism and Metabolic Syndrome Are Associated With Changes in Serum-Derived microRNAs in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:242.

208. Jiang L, Li W, et al. Circulating miRNA-21 as a Biomarker Predicts Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) in Patients. *Clin Lab.* 2015;61(8):1009-15.

209. Han Y, Xu GX, et al. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7131-9.

210. Pink RC, Samuel P, et al. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2015;137(1):143-51.

211. Mase Y, Ishibashi O, et al. MiR-21 is enriched in the RNA-induced silencing complex and targets COL4A1 in human granulosa cell lines. *Reprod Sci.* 2012;19(10):1030-40.

212. Murri M, Insenser M, et al. Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):E1835-44.
213. Kim YJ, Hwang SH, et al. MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues. *J Cell Physiol.* 2012;227(1):183-93.
214. Hasakova K, Bezakova J, et al. Gender-dependent expression of leading and passenger strand of miR-21 and miR-16 in human colorectal cancer and adjacent colonic tissues. *Physiol Res.* 2017;66(Suppl 4):S575-S82.
215. Kruijver FP, Fernandez-Guasti A, et al. Sex differences in androgen receptors of the human mamillary bodies are related to endocrine status rather than to sexual orientation or transsexuality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):818-27.
216. Taheri M, Eghtedarian R, et al. Non-coding RNAs and type 2 diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem.* 2020:1-10.
217. Olivieri F, Spazzafumo L, et al. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. *Oncotarget.* 2015;6(34):35372-82.
218. Jiang Q, Han Y, et al. Ursolic acid induced anti-proliferation effects in rat primary vascular smooth muscle cells is associated with inhibition of microRNA-21 and subsequent PTEN/PI3K. *Eur J Pharmacol.* 2016;781:69-75.
219. Luo M, Tan X, et al. MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway. *Sci Rep.* 2017;7:43427.
220. Ben Salem A, Megdich F, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGFA) gene variation in polycystic ovary syndrome in a Tunisian women population. *BMC Genomics.* 2016;17(Suppl 9):748.
221. Pietrowski D, Szabo L, et al. Ovarian hyperstimulation syndrome is correlated with a reduction of soluble VEGF receptor protein level and a higher amount of VEGF-A. *Hum Reprod.* 2012;27(1):196-9.

222. Ding EL, Song Y, et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1152-63.
223. Willeit P, Skrobilin P, et al. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2017;66(2):347-57.
224. Song DK, Sung YA, et al. The Role of Serum MicroRNA-6767-5p as a Biomarker for the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163756.
225. Jiang B, Xue M, et al. Upregulation of microRNA-204 improves insulin resistance of polycystic ovarian syndrome via inhibition of HMGB1 and the inactivation of the TLR4/NF-kappaB pathway. *Cell Cycle*. 2020;19(6):697-710.
226. Malita FM, Karelis AD, et al. Surrogate indexes vs. euglycaemic-hyperinsulinemic clamp as an indicator of insulin resistance and cardiovascular risk factors in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Metab*. 2006;32(3):251-5.
227. Luo Y, Cui C, et al. The role of miRNAs in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(2):289-304.
228. Hedayatnia M, Asadi Z, et al. Dyslipidemia and cardiovascular disease risk among the MASHAD study population. *Lipids Health Dis*. 2020;19(1):42.
229. Abente EJ, Subramanian M, et al. MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Arch Biochem Biophys*. 2016;589:108-19.
230. Hossain MM, Sohel MM, et al. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res*. 2012;349(3):679-90.
231. Carletti MZ, Christenson LK. MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J Anim Sci*. 2009;87(14 Suppl):E29-38.
232. Xu YW, Wang B, et al. Differentially expressed microRNAs in human oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(6):559-66.
233. Virant-Klun I, Stahlberg A, et al. MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3984937.

234. Assou S, Al-edani T, et al. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod.* 2013;28(11):3038-49.
235. Vendola KA, Zhou J, et al. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest.* 1998;101(12):2622-9.
236. Stubbs SA, Stark J, et al. Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4418-26.
237. Das M, Djahanbakhch O, et al. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):881-7.
238. Haouzi D, Assou S, et al. Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012;27(12):3523-30.
239. Yang JL, Zhang CP, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis. *Endocrinology.* 2010;151(2):774-82.
240. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006;132(2):191-206.
241. Tomic D, Miller KP, et al. Ovarian follicle development requires Smad3. *Mol Endocrinol.* 2004;18(9):2224-40.
242. Li Q, Pangas SA, et al. Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo. *Mol Cell Biol.* 2008;28(23):7001-11.
243. Pangas SA, Li X, et al. Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2006;20(6):1406-22.
244. Zhong X, Chung AC, et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(9):1668-81.
245. Lu J, Xue Y, et al. CiRS-126 inhibits proliferation of ovarian granulosa cells through targeting the miR-21-PDCD4-ROS axis in a polycystic ovarian syndrome model. *Cell Tissue Res.* 2020;381(1):189-201.

246. Belguith I, Dhieb D, et al. Diagnostic value of miR-199a and miR-21 in the plasma of infertile women with dysregulated AMH levels. *Hum Fertil (Camb)*. 2020:1-12.

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

ARTIGOS PUBLICADOS

- **Prevalence of Metabolic Disturbances Among Women with Polycystic Ovary Syndrome in Different Regions of Brazil**

Giovana De Nardo Maffazioli, Caroline Panone Lopes, Vanessa Heinrich-Oliveira
Rogerio A Lobo, Sylvia Hayashida, José Maria Soares, Gustavo Arantes Rosa
Maciel, Edmund Chada Baracat

International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2020; 151(3):383-91

- **Steroid Screening Tools Differentiating NonClassical Congenital Adrenal Hyperplasia and Polycystic Ovary Syndrome**

Giovana D N Maffazioli, Tânia A S S Bachega, Sylvia A Y Hayashida, Larissa G
Gomes, Helena P L Valassi, Jose A Marcondes, Berenice B Mendonça, Edmund
C Baracat, Gustavo A R Maciel

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. August 2020 105(8)1-8

- **Nutritional and Dietary Aspects in Polycystic Ovary Syndrome: Insights into the Biology of Nutritional Interventions**

Luísa P P Neves, Rodrigo R Marcondes, **Giovana D N Maffazioli**, Ricardo S
Simões, Gustavo A R Maciel, José Maria S Jr, Edmund C Baracat

Gynecol Endocrinol. 2020 Dec; 36 (12): 1047-1050.

- **Could be miRNAs signature useful to uterine sarcomas and carcinosarcomas prognosis and treatment prediction?**

Laura Gonzalez dos Anjos, Bruna Cristine de Almeida, Thais de Almeida, André Rocha, **Giovana De Nardo Maffazioli**, Fernando Soares, Isabela da Cunha, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Cancers (Basel). 2018 Sep 6; 10(9).

- **Oncomirs Expression Profiling in Uterine Leiomyosarcoma Cells.**

Bruna Cristine de Almeida, Natalia Garcia, **Giovana De Nardo Maffazioli**, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(1): 52.

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

- **“Alteraciones metabólicas en el síndrome de ovario poliquístico y estrategias terapêuticas”**, Autores: Gustavo Arantes Rosa Maciel, Giovana De Nardo Maffazioli e Edmund Chada Baracat, publicado no livro *“Manual Clínico de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva”* da Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva, 2019, Capítulo 12
- **“Reserva Ovariana: O que solicitar?”**, Autores: Gustavo Arantes Rosa Maciel, Vanessa Heirinch-Oliveira e Giovana De Nardo Maffazioli, publicado no livro *“Manual de Ginecologia da SOGESP”* Ed dos Editores, São Paulo, 2019, Capítulo 16, páginas 147-157

APRESENTAÇÃO DE PÔSTERES

- **Variation of Antimullerian Hormone (AMH) Measurements and Its Impact on Prescription and Predicted Response in Controlled Ovarian Stimulation**

G. Maciel, **G. Maffazioli**, V. Heinrich, C. Lopes, R. P. Biscolla, J. De Sá, C. Ferrer, J. Vieira, E. Baracat

36 Annual Meeting of the ESHRE, nos dias 5 a 8 de Julho de 2020, congresso realizado online devido à pandemia

- **Variação entre coletas do hormônio anti-mulleriano (AMH) e seu impacto na conduta e prognóstico em reprodução humana assistida”**

Giovana De Nardo Maffazioli, Vanessa Heinrich Barbosa de Oliveira, Caroline Panone Lopes, Rosa Paula Biscolla, José de Sá, Cláudia Maria Ferrer, Edmund Chada Baracat, Gustavo Arantes Rosa Maciel

58 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, nos dias 13 a 16 de novembro de 2019, Porto Alegre, Brasil

- **Differences in Clinical Manifestations Between Lean and Overweight/Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome in Brazil**

Giovana De Nardo Maffazioli, Caroline Panone Lopes, Vanessa Heinrich-Oliveira, Sylvia Hayashida, José Maria Soares Jr., Rogerio Lobo, Edmund C Baracat, Gustavo A R Maciel

17 Androgen Excess & PCOS Society Annual Meeting, nos dias 7 a 9 de novembro de 201, Foz do Iguaçu, Brasil

- **Precursor-to-Product Ratio as a Screening Tool for the Differentiation of Non-Classical Congenital Adrenal Hyperplasia and Polycystic Ovary Syndrome**

Giovana D N Maffazioli, Tânia A S S Bachega, Sylvia A Y Hayashida, Jose A Marcondes, Berenice B Mendonça, Edmund C Baracat, Gustavo A R Maciel

17 Androgen Excess & PCOS Society Annual Meeting, nos dias 7 a 9 de novembro de 201, Foz do Iguaçu, Brasil

- **Evaluación del grado de satisfacción sexual em las mujeres com síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser después del tratamiento com dilatadores vaginales: um studio piloto**

Maffazioli G, Schaefer M, Briceno E, Abdo C, Hayashida S, Baracat E, Maciel GA, Almeida JA

XVI Congresso Latinoamericano de Obstetrícia e Ginecologia de La Infancia Y La Adolescencia, Paraguai, 2019

Trabalho ganhador como segundo melhor pôster do congresso

- **Dilatação Vaginal Progressiva como Primeira Escolha no Tratamento da Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser**

Giovana De Nardo Maffazioli, Mariana Soares Pereira Schaefer, Andrea Sclowitz Moraes, José Alcione Macedo Almeida

XV Congresso Brasileiro de Obstetrícia e Ginecologia da Infância e Adolescência e do VIII Simpósio Internacional de Boas Práticas em Saúde do Adolescente nas Américas, em São Paulo, 2018

- **Hipopituitarismo após Ressecção Cirúrgica de Astrocitoma Pilocítico Hipotalâmico: Relato de Caso**

Giovana De Nardo Maffazioli, Mariana Soares Pereira Schaefer, Andrea Sclowitz Moraes, José Alcione Macedo Almeida

XV Congresso Brasileiro de Obstetrícia e Ginecologia da Infância e Adolescência e do VIII Simpósio Internacional de Boas Práticas em Saúde do Adolescente nas Américas, em São Paulo, 2018

- **Diferentes Respostas ao Desenvolvimento Mamário à Terapia de Reposição Hormonal em Pacientes com DDS XY: Relato de Dois Casos**

Giovana De Nardo Maffazioli, Mariana Soares Pereira Schaefer, Andrea Sclowitz Moraes, José Alcione Macedo Almeida

XV Congresso Brasileiro de Obstetrícia e Ginecologia da Infância e Adolescência e do VIII Simpósio Internacional de Boas Práticas em Saúde do Adolescente nas Américas, em São Paulo, 2018

- **Metabolic Impairments Across Different Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) in Brazil**

Maffazioli GD, Lopes CP, Azevedo RS, Hayashida S, Marcondes RR, Iahn-Aun M, Soares Jr JM, Maciel GAR, Baracat EC

Androgen Excess & PCOS Society, Estocolmo, Suécia, 2018

- **Intermittent Fasting in Polycystic Ovary Syndrome Model in Rats: Evaluation of Metabolic and Reproductive Effects**

Neves LPP, Marcondes RR, **Maffazioli GD**, Catanozi S, Furukawa LNS, Faria DP, Gregório CCR, Hayashida S, Garcia N, Silva JC, Araújo, GS, Pedrozo KV, Carvalho KC, Baracat EC, Maciel GAR

Androgen Excess & PCOS Society, Estocolmo, Suécia, 2018

- **Características Clínicas e Hormonais de Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos Metabolicamente Saudáveis**

Giovana De Nardo Maffazioli, Caroline Panone Lopes, Marina Iahn Aun, Edmund Chada Baracat, Gustavo Arantes Rosa Maciel

XXIII Congresso Paulista de Ginecologia e Obstetrícia (SOGESP), em São Paulo, 2018

- **Danos Metabólicos Entre os Fenótipos da Síndrome dos Ovários Policísticos**

Caroline Panone Lopes, **Giovana De Nardo Maffazioli**, Raymundo Soares Azevedo, Marina Iahn Aun, Edmund Chada Baracat, Gustavo Arantes Rosa Maciel

XXIII Congresso Paulista de Ginecologia e Obstetrícia (SOGESP), em São Paulo, 2018

- **Evaluation of Differences in Clinical Characteristics Between Patients with Classical Karyotype of Turner Syndrome and Mosaics**

Maffazioli G, Heinrich V, Hayashida S, Baracat E, Maciel G

The 18th World Congress of Gynecological Endocrinology em Florença, Itália, 2018

- **Impact of Metformin and Exercise, Isolated or Associated, on Morphology and Oxidative Stress in Adipose Tissue of a Polycystic Ovary Syndrome Rat Model**

Marcondes R, Gonçalves T, Araújo G, Guerra B, Mori M, **Maffazioli G**, Gomes-Santos I, Negrão C, Carvalho K, Baracat E, Maciel G.

The 18th World Congress of Gynecological Endocrinology em Florença, Itália, 2018

- **A Case of 46, XY, Gonadal Dysgenesis with Remaining Epididymis Mimicking Ovotesticular Disorder of Sexual Development**

Ferreira Filho E, **Maffazioli G**, Lopes C, Aun M, Hayashida S, Baracat E, Maciel G.

The 18th World Congress of Gynecological Endocrinology em Florença, Itália, 2018

- **Treatment with Exercise Plus Metformin Reduces the Size of Mesenteric Adipocytes in a Polycystic Ovary Syndrome Rat Model**

Marcondes R, Gonçalves T, Araújo G, Guerra B, Mori M, **Maffazioli G**, Gomes-Santos I, Negrão C, Carvalho K, Baracat E, Maciel G

The Endocrine Society Meeting, ENDO, em Chicago, Illinois, 2018

- **Performance Comparison Between-Three Commercial Immunoassays for AMH**

Chiamolera M.I., Ferrer C.M.A F, Brito E. A. Kasamatsu T., **Maffazioli G.D.N.**, Teles M. G., Biscolla R.P.M., Magnus D.S.R., Vieira J.G., Maciel G.A.R

The Endocrine Society Meeting, ENDO em Orlando, Flórida, 2017

- **The Metabolic Syndrome in Brazilian Polycystic Ovary Syndrome in Seven Years of Follow-up**

Yamashita S.A.Y., Soares Jr J.M., Maciel G.A.R., Curi D.G, Aun M.I., **Maffazioli**

G.D.N., Neves E.M, Lopes C.P., Baracat M.C., Baracat E.C

The Endocrine Society Meeting, ENDO, em Orlando, Flórida, 2017

APRESENTAÇÕES ORAIS

- **O Perfil de Expressão dos miRNAs da Família Lethal-7 (Let-7) e seu Papel no Prognóstico em Leiomiossarcoma uterino**

Laura Gonzales dos Anjos, Bruna Cristine de Almeida, **Giovana De Nardo Maffazioli**, Thais Gomes de Almeida, Isabela Werneck da Cunha, Edmund Chada Baracat, Kátia Candido Carvalho

58 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, nos dias 13 a 16 de novembro de 2019, Porto Alegre, Brasil

- **MicroRNAs como Potenciais Biomarcadores Auxiliares no Diagnóstico Diferencial entre os Tipos de Sarcomas e Carcinossarcomas Uterinos**

Bruna Cristine de Almenida, Laura Gonzales dos Anjos, Miyuki Uno, **Giovana De Nardo Maffazioli**, Thaís Gomes de Almeida, Edmund Chada Baracat, Kátia Cândido Carvalho

58 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, nos dias 13 a 16 de novembro de 2019, Porto Alegre, Brasil

- **Variação entre coletas do hormônio anti-mulleriano (AMH) e seu impacto na conduta e prognóstico em reprodução humana assistida”**

Giovana De Nardo Maffazioli, Vanessa Heinrich Barbosa de Oliveira, Caroline Panone Lopes, Rosa Paula Biscolla, José de Sá, Cláudia Maria Ferrer, Edmund Chada Baracat, Gustavo Arantes Rosa Maciel

29 Jornada do Conhecimento do Laboratório Fleury, no dia 10 de outubro de 2019, São Paulo, Brasil

- **Evaluation of the Impact of Low L-Carnitine Levels in Metabolic and Hormonal Profile of Polycystic Ovary Syndrome**

Maffazioli G, Marcondes R, Pimenta L, Baracat E, Da Silva I, Maciel G

The 18th World Congress of Gynecological Endocrinology em Florença, Itália, 2018

– **Vencedor do Full Congress Package Scholarship**

- **Evaluation of Reproductive Function in a Rat Model of Genetic Epilepsy Absence Seizures**

Maffazioli G, De Souza T, Marcondes R, Da Silva L, Gonçalves T, Carvalho K, Baracat E, Maciel G, Valle A

The 18th World Congress of Gynecological Endocrinology em Florença, Itália, 2018