



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

IVANA RIPPEL HAUER

**ANÁLISE GENÉTICA DE REGIÃO CANDIDATA À
SUSCEPTIBILIDADE PARA A SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO
(SOP).**

**CURITIBA
2008**

IVANA RIPPEL HAUER

**ANÁLISE GENÉTICA DE REGIÃO CANDIDATA À
SUSCEPTIBILIDADE PARA A SÍNDROME DO OVÁRIO
POLICÍSTICO (SOP).**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como
requisito á obtenção ao título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr Fábio Rueda Faucz

CURITIBA
2008

IVANA RIPPEL HAUER

**ANÁLISE GENÉTICA DE REGIÃO CANDIDATA À
SUSCEPTIBILIDADE PARA A SÍNDROME DO OVÁRIO
POLICÍSTICO (SOP).**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como
requisito à obtenção ao título de Mestre.

Banca Avaliadora

Prof^a Dr^a Vivian Ferreira do Amaral (PUCPR)

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen de Souza (UFPR)

Curitiba, 04 de agosto de 2008

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fábio Rueda Faucz por seu auxílio e comprometimento em todos os momentos necessários deste trabalho.

Aos pacientes da Clínica Fertway que atenderam ao pedido de coleta de sangue com muita rapidez e boa vontade.

Aos meus pais, incansáveis, que me ajudaram com o meu filho nestes dois anos .

Ao meu marido, que sempre me incentivou em todos os momentos.

Ao meu amado filho Augusto, obrigada por você estar aqui comigo.

A minha colega Renata Werneck, pela seu desprendimento em me ajudar.

Aos estagiários do Laboratório de Genética, pela grande ajuda.

As enfermeiras da Clínica Fertway, pela colaboração na coleta das amostras.

Ao Doutor Francisco Furtado Filho, meu sócio e amigo, pela ajuda na coleta das pacientes para a pesquisa.

RESUMO

A Síndrome do Ovário Policístico afeta 4 a 12% das mulheres em idade reprodutiva. A doença possui várias formas de manifestações clínicas por isto é de difícil diagnóstico. Os critérios para avaliar esta doença foram revisados em 2003. A hipótese é de que seja uma doença ovariana caracterizada por uma excessiva produção de andrógenos e que sua heterogeneidade possa ser explicada com base na interação da doença com outros genes e com o ambiente. O presente trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade do gene *CAPN10* e a sua relação com a Síndrome do ovário policístico. A metodologia utilizada consistiu na obtenção de amostras sanguíneas de 50 pacientes portadoras de Síndrome do Ovário Policístico e 150 controles, utilizando os critérios de inclusão e exclusão para a doença. Após coleta, extração, amplificação e análise do DNA e dos marcadores, as frequências alélicas e genotípicas dos dois grupos foram calculadas e todos os marcadores estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com a utilização do software THESIAS os haplótipos em desequilíbrio de ligação foram construídos após 2501 interações. Seis haplótipos foram confirmados e suas frequências e *Odds Ratio* (OR) foram avaliados para ambos os grupos. Dois haplótipos mostraram-se predisponentes para a doença: o haplótipo **TGA2** (OR=3,73778, p=0,00065) e o haplótipo **TAG3** (OR=3,01389, p=0,003902). O haplótipo **TGG3** foi considerado um haplótipo protetor para a doença (OR=0,25). Com o auxílio do teste exato de Fischer e pelo modelo de regressão logística observou-se que o marcador rs3792267 (SNP-43) e o rs2975762 (SNP-56) apresentavam associação com a doença. O efeito do marcador rs2975762 mostrou-se mais intenso, sendo o alelo A tido como predisponente e o alelo G como protetor para a doença.

Palavras-chave: Síndrome do Ovário Policístico, SOP, *CAPN10*, infertilidade, calpaina.

ABSTRACT

The Polycystic Ovary Syndrome affects 4 to 12% of the women during the reproductive age. This disease has several forms of clinical evidence, and is therefore difficult to diagnose. The criteria for evaluation of this disease were reviewed in 2003. The hypothesis is that the syndrome is a genetically determined ovarian disease due to an excessive production of androgens and its heterogeneity is explained by the interaction with other genes and the environment. The objective of the present study is to analyze the variability of the *CAPN10* gene and its relationship with the Polycystic Ovary Syndrome. The methodology used consisted of obtaining blood samples from 50 patients with Polycystic Ovary Syndrome and 150 controls, using the inclusion and exclusion criteria for diagnosis. After collection, extraction, amplification, and DNA and marker analysis, the allelic and genotypic frequencies from both groups were evaluated and all markers were in Hardy-Weinberg equilibrium. Using the software THESIAS, the haplotypes under linkage disequilibrium were constructed after 2501 interactions. Six haplotypes in linkage disequilibrium were confirmed and their frequencies and Odds Ratio (OR) were evaluated for both groups. Two haplotypes were shown to predispose the disease: the haplotype **TGA2** (OR=3.73778, p=0.00065) and the haplotype **TAG3** (OR=3.01389, p=0.003902). The haplotype **TGG3** was considered a protector against the disease (OR=0.25). With the help of exact Fischer Test and logistic model of regression, we observed that the markers rs3792267 (SNP-43) and the rs2975762 (SNP-56) presented an association with the disease. The effect of marker rs2975762 (SNP-56) was more intense, while the A allele predisposed the disease and the G allele was a protector.

Palavras-chave: Síndrome do Ovário Policístico, SOP, *CAPN10*, infertilidade, calpaina.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>CAPN10</i>	Gene da Calpaína 10
<i>cDNA</i>	DNA complementar
<i>DMT2</i>	Diabete Melito Tipo II
<i>FSH</i>	Hormônio Folículo Estimulante
<i>GTT</i>	Teste de Tolerância á Glucose
<i>HDL-C</i>	high-density lipoprotein cholesterol
<i>IC</i>	Intervalo de Confiança
<i>Ins/del</i>	inserção/deleção
<i>kb</i>	kilobase
<i>LH</i>	Hormônio Luteinizante
<i>OR</i>	Odds Ratio
<i>PCR</i>	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>Pb</i>	pares de base
<i>SOP</i>	Síndrome do Ovário Policístico
<i>SSCP</i>	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples
<i>SNP</i>	Polimorfismo de Nucleotídio Único
<i>SNP ID</i>	identificação do SNP
<i>TCLE</i>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>THESIAS</i>	Testing Haplotype effects in Association Studies
<i>UCSNP</i>	Polimorfismo de Nucleotídeo único do Gene Calpaina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Idade e Grupo Étnico
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações e tamanho dos fragmentos obtidos
Tabela 3	Freqüência conjunta dos alelos para cada locus e valores de p
Tabela 4	Distribuição gênica e genotípica para os marcadores analisados
Tabela 5	Freqüências genotípicas em análise univariada
Tabela 6	Freqüências de haplótipos estimadas em pacientes e controles
Tabela 7	Resultados obtidos a partir de análise multivariada

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

- Figura 1 Splicing alternativo do RNAm da CAPN10
- Figura 2. Padrões encontrados na análise dos marcadores rs2975760 (SNP 44) e rs3792267 (SNP43)
- Figura 3. Padrões encontrados na análise do marcador rs2975762 (SNP 56).
- Figura 4. Padrões encontrados na análise do marcador rs3842570 (SNP 19).
- Figura 5 Desequilíbrio de ligação entre os marcadores analisados
- Quadro 1 Critérios de síndromes metabólicas em mulheres com SOP
- Quadro 2 Soluções utilizadas para extração de DNA

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS E QUADROS.....	viii
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Características clínicas da Síndrome do Ovário Policístico.....	10
1.2 Aspectos genéticos da da Síndrome do Ovário Policístico.....	14
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.1 Objetivos Específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Constituição da amostra.....	21
3.2 Critérios de Seleção dos Polimorfismos de Nucleotídeos únicos.....	22
3.3 Extração de DNA.....	22
3.4 Reação em Cadeia da DNA Polimerase.....	24
3.5 Análise do marcador rs3842570.....	26
3.6 Coloração com nitrato de prata.....	26
3.7 Detecção de mutações por polimorfismo conformacional de fita simples..	28
3.8 Montagem de haplótipos.....	29
3.9 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Idade dos indivíduos participantes.....	31
4.2 Caracterização das variantes dos marcadores analisados.....	31
4.3 Frequencia dos marcadores analisados.....	33
4.4 Análise univariada dos marcadores.....	34
4.5 Frequência dos haplótipos formados.....	36
4.6 Análise de associação entre os haplótipos e SOP	37
4.7 Análise de desequilíbrio de ligação.....	38
4.8 Análise multivariada.....	40
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
7. ANEXO.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características clínicas da Síndrome do Ovário Policístico

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) foi descrita pela primeira vez em 1935 por Stern e Leventhal (*apud* SHEEHAN, 2004). A falta de critérios bem definidos para o diagnóstico da SOP faz com que a identificação desta doença comum seja muito difícil. A SOP tem diversas formas de manifestação clínica que geralmente são: irregularidade menstrual, hirsutismo (crescimento excessivo de pêlos terminais em mulheres, em áreas como face, queixo, coxas, tórax e triângulo pélvico superior), subfertilidade, resistência à insulina associada ao risco de diabetes melito do tipo 2, obesidade e doenças cardiovasculares (SHEEHAN, 2004).

A SOP é uma doença endócrina heterogênea que, de acordo com o consenso de 2003 no ESHRE/ASRM (Sociedade Européia de Reprodução Humana e Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva) (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004), afeta de 4 a 12 % das mulheres em idade reprodutiva e se caracteriza pela presença de pelo menos duas das seguintes características: ovários policísticos avaliados por ultra-sonografia, oligo ou anovulação e evidências clínicas ou bioquímicas de hiperandrogenismo (URBANEK et al, 2000). Estudos mais recentes mostram uma prevalência entre 7 e 10% (DASGUPTA; REDDY, 2008).

A SOP é responsável por 75% das infertilidades anovulatórias. Adicionalmente, se e quando a gravidez ocorre, a taxa de abortamento no primeiro trimestre é alta entre 30 a 50% (SHEEHAN et al, 2004).

Aproximadamente 18 anos se passaram desde a primeira conferência internacional sobre a SOP realizada em Bethesda, MD pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH). Os critérios recomendados com base na maioria das evidências clínicas foram os seguintes: evidências clínicas ou bioquímicas de hiperandrogenismo, anovulação crônica e exclusão de outras doenças conhecidas. A definição destes critérios foi o primeiro passo para padronizar o diagnóstico desta síndrome. Desde 1990, quando ocorreu esta conferência sobre a SOP, tem sido estimado que a síndrome contenha um espectro de sinais e sintomas de disfunção ovariana mais amplo do que aqueles definidos pelo critério original de diagnóstico (ZAWADSKI JK et al, 1992). Até hoje os critérios são um pouco controversos, porém uma homogeneização do diagnóstico parece ter sido alcançada (PORTER, 2008).

As discrepâncias no estabelecimento clínico para o diagnóstico da SOP foram observadas durante muito tempo, o que trouxe a necessidade do estabelecimento de um conjunto de características mínimas necessária para sua caracterização. Principalmente pelo fato de que estas discrepâncias criavam um grande problema para a análise de associação e/ou ligação genética nesta síndrome (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004).

Os critérios diagnósticos da SOP foram recentemente revisados pelo The Rotterdam ESHRE/ASRM sponsored SOP consensus workshop group (2004). Os postulados de 1990 requeriam dois fatores de diagnósticos (Anovulação crônica; Sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e exclusão de outras etiologias) e os atuais requerem dois de três fatores (Oligo e/ou anovulação; Sinais clínicos e bioquímicos de hiperandrogenismo; Ovário policístico e exclusão de outras

etiologias como hiperplasia congênita adrenal, tumores secretores de androgênios e síndrome de Cushing).

Dentre os sinais bioquímicos observa-se na SOP a alta dosagem de testosterona e de hormônio luteinizante (LH), mas com concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) normais (GONZALEZ et al, 2003). Ambos os níveis absolutos de LH circulante e sua relação com os níveis de FSH são significativamente elevados em mulheres com SOP se comparado ao grupo controle. Concentrações elevadas de LH (acima de 95% do percentil normal) podem ser observadas em aproximadamente 60% das mulheres com SOP (GANDAR; SPIZZO; COLLIN, 1999; SAGNELLA et al, 2008).

Ovários policísticos são agora considerados como um dos possíveis critérios para SOP. De acordo com a literatura disponível (PACHE et al, 1992; VAN SANTBRINK et al, 1997; JONARD et al, 2003) os critérios para definir ovário policístico são os seguintes: presença de 12 ou mais folículos em cada ovário medindo de 2-9 mm de diâmetro, e/ou aumento do volume ovariano $>5.5\text{cm}^2$ ou volume (> 11 ml). A morfologia típica de ovário policístico está presente em cerca de 20% da população feminina normal, muitas destas sem hirsutismo, com menstruações regulares e concentração de testosterona e gonadotrofinas normais (SHEEHAN, 2004).

As características clínicas e bioquímicas são as bases para a investigação das possíveis origens genéticas da SOP. A anormalidade mais comum em mulheres com ovários policísticos é a hipersecreção de andrógenos (FRANKS, 1995; SHARQUIE, et al, 2007), sendo que o fenótipo clínico da SOP envolve determinar a presença clínica ou bioquímica do excesso de andrógenos (hiperandrogenismo),

enquanto se exclui doenças relacionadas a hiperandrogenismo clínico. Para a maioria dos participantes do consenso, o primeiro indicador clínico do excesso de andrógenos é a presença de hirsutismo. Porém muitos dados normativos em grandes populações foram perdidos. A avaliação do hirsutismo é relativamente subjetiva e poucos médicos, na prática, usam métodos de padronização (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004). A evidência mais aceita é a associação clínica e ou bioquímica de excesso de andrógenos em anovulação crônica (MATALLIOTAKIS et al, 2006).

A resistência à insulina está associada com anormalidades reprodutivas em SOP. A resistência à insulina em mulheres com SOP parece ser mais comum (cerca de 50%) tanto em mulheres obesas quanto em normais (SAWATHIPARNICH et al, 2005; PASQUALI; GAMBINERI, 2006). Existem alguns critérios (quadro.1) que podem ser usados para que se possam avaliar as síndromes metabólicas em mulheres com SOP (MAGNOTTI; FUTTERWEIT, 2007; ESSAH et al, 2007).

Quadro 1. Critérios de Síndrome metabólica em mulheres com SOP.

Fator de Risco	Valor de Referência para Síndromes Metabólicas
obesidade abdominal (circunferência da cintura)	> 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dl
HDL-C	< 50 mg/dl
Pressão Sanguínea	≥ 130 / ≥85 mm Hg
Glicemia em jejum e duas horas após o GTT	110-126 mg/dl e ou 2 H glucose 140-199 mg/dl

NOTA:HDL-C *high-density lipoprotein cholesterol*; H – horas

FONTE: adaptado de MAGNOTTI; FUTTERWEIT, 2007 e ESSAH et al, 2007.

No consenso realizado em 2003 um sumário foi feito para auxiliar no rastreamento de doenças metabólicas que são:

- 1- Nenhum teste de resistência à insulina é necessário para fazer o diagnóstico de SOP, nem são necessários para selecionar o tratamento;

2- Mulheres obesas com SOP devem ser selecionadas para rastreamento de doenças metabólicas incluindo intolerância à glucose através de um teste de tolerância a glicose oral;

3- Mais estudos são necessários nas mulheres não obesas com SOP para determinar a utilidade dos critérios acima relacionados. Entretanto, devem ser considerados os fatores de risco adicionais para a resistência à insulina, tais como história familiar de diabetes.

1.2 Aspectos Genéticos da Síndrome do Ovário Policístico

A hipótese é de que esta síndrome seja uma doença ovariana determinada geneticamente, caracterizada por uma produção excessiva de andrógeno e que a sua heterogeneidade possa ser explicada com base na interação da doença com outros genes e com o ambiente (DIAMANTI-KANDARAKIS et al, 2006).

A observação de que SOP é segregada em famílias fornece uma argumentação consistente para que seja proposta uma base genética para esta (JAKUBOWSKI, 2005). Entretanto o modo de transmissão da SOP ainda não foi estabelecido. Embora alguns trabalhos forneçam suporte para a participação de um único gene dominante com alta penetrância (GOVIND; OBHRAI; CLAYTON, 1999), em outros trabalhos isto já não é observado (AMATO; SIMPSON, 2004; LUQUE-RAMIREZ et al, 2006).

O modo de transmissão de herança autossômica dominante não foi descartado por completo (CARMINA; AZZIZ, 2006). Um mecanismo autossômico dominante é possível, mas é muito mais provável que mais genes estejam

envolvidos. A prevalência de casos de ovários policísticos em famílias pode ser mais bem explicada pela base oligogênica (FRANKS et al, 1997; CARMINA; AZZIZ, 2006; FRANKS et al, 2008). Sugere-se que a heterogeneidade observada deva ser atribuída a interação de um pequeno número de genes entre si com fatores ambientais (principalmente nutricionais) (FRANKS; MCCARTHY; HARDY, 2006; DIAMANTI-KANDARAKIS et al, 2006).

Muitas vias bioquímicas têm sido implicadas na patogênese da SOP. Muitos genes destas vias têm sido testados, incluindo-se genes envolvidos na biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides (*StAR, CYP11, CYP17, CYP19 HSD17B1-3, HSD3B1-2*), gonadotropina e hormônios de ação gonadal (*ACTR1, ACTR2A-B, FS, INHA, INHBA-B, INHC, SHBG, LHCGR, FSHR, MADH4, AR*), obesidade e regulação de energia (*MC4R, OB, OBR, POMC, UCP2-3*), genes relacionados a secreção e ação da insulina (*IGF1, IGF1R, IGFBP1-3, IR, INSL, IRS1-2, PPARG*) e muitos outros (para revisão vide JAKUBOWSKI, 2005; GOODARZI, 2008), porém até o momento nenhuma associação consistente entre polimorfismos gênicos e SOP pode ser identificado (SCHURING et al, 2008; SIMONI et al, 2008).

A SOP é conhecida por estar associada com um aumento no risco de diabetes melito tipo II (DMT2) e tem sido proposto que ela compartilha a mesma base genética que esta doença. O mecanismo relacionado a esta predisposição não está completamente compreendido, entretanto está bem estabelecido que tanto a resistência à insulina quanto o defeito na secreção da insulina estão presentes em mulheres não diabéticas com SOP (HADDAD et al, 2002).

Doenças como a SOP possuem múltiplas variantes que contribuem para a etiologia da doença como resultado de uma heterogeneidade genética (variantes em

múltiplos genes) e/ou heterogeneidade alélica (múltiplos variantes dentro de um gene). É muito difícil caracterizar variação genética de um gene candidato incluindo as regiões reguladoras, na maioria dos estudos genéticos da SOP, somente um ou poucos variantes por gene tem sido testados e muito poucos estudos tem caracterizado o gene utilizando polimorfismos de um nucleotídeo ou utilizando indiretamente análise de haplótipos (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2008).

Dado as limitações dos estudos genéticos de SOP existem alguns *loci* para os quais existe uma forte evidência de acordo com o papel na SOP e alguns poucos genes adicionais para os quais um consenso pode ser alcançado em um futuro próximo. Estes loci incluem CYP11A (SAN MILLAN et al, 2001; GAASENBEEK et al, 2004; WOOD JR et al, 2004; WANG et al, 2006), CAPN10 (URBANEK et al, 2001; EHRMANN et al, 2002; HADDAD et al, 2002; VOLLMERT et al, 2007; WILTGEN et al, 2007) e D19S884 (URBANEK et al, 2005; STEWART et al, 2006; URBANEK, 2007). Estudos recentes sugerem que variações no gene que codifica a cisteína protease calpaina 10 (*CAPN10*) estão associados com a resistência à insulina e influência genética na susceptibilidade a um tipo de diabetes (EHRMANN et al, 2002), sendo que o *locus* que contém o gene *CAPN10* foi identificado como um *locus* de susceptibilidade para DMT2 (URBANEK et al, 2007).

De acordo com Horikawa e colaboradores (2000), o gene *CAPN10* codifica um membro ubiquamente expressado da família cisteína protease cálcio-dependente. A proteína calpaina-10 é um heterodímero constituído de uma subunidade pequena que é invariável e uma subunidade grande variável. A subunidade grande possui 4 domínios: domínio I, o domínio N-terminal, que é processado após ativação da calpaina; domínio II, o domínio protease; domínio III,

um domínio de ligação com função desconhecida; e o domínio IV, que é o domínio de ligação do cálcio. Horikawa e colaboradores (2000) determinaram que o gene *CAPN10* contém 15 exons e uma extensão de 31 kb de seqüência genômica que codifica uma protease intracelular com 672 aminoácidos e se localiza no cromossomo humano 2q37.3. A análise do cDNA humano mostrou um padrão complexo de *splicing* alternativo originando proteínas de 672, 544, 517, 513, 444, 274, 139 e 138 aminoácidos (Figura 1).

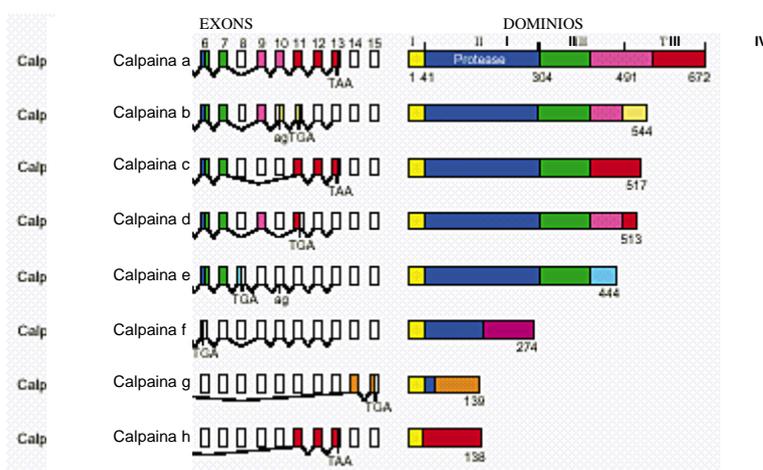


Figura 1. Splicing alternativo do RNAm da CAPN10.

NOTA: Padrão de splicing alternativo e a organização das proteínas calpaina-10 originadas pelo splicing alternativo. Os quatro domínios que definem as calpainas são observados. O número indica os resíduos de aminoácidos e os limites entre os domínios

Na última década, três importantes estudos (URBANEK et al, 2001; EHRMANN et al, 2002; HADDAD et al, 2002) examinaram a contribuição do gene *CAPN10* na etiologia da SOP, mais recentemente Vollmert e colaboradores (2007) e Wiltgen e colaboradores (2007) também publicaram importantes estudos sobre *CAPN10*.

No estudo de Ehrmann e colaboradores (2002) foram analisadas um total de 212 pacientes com SOP das quais 124 (58%) eram mulheres brancas de origem

européia, 57 (27%) afro-americanas, 13 (6%) hispânicas, 13 (6%) asiáticas-americanas e 5 (3%) origem oriente médio. Foram analisados três polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) do gene *CAPN10* (SNPs 43,19 e 63). Inicialmente os grupos de mulheres brancas e afro-americanas foram estudados separadamente devido às frequências alélicas serem um pouco diferentes. Quatro haplótipos principais foram observados em ambos os grupos, entretanto as frequências diferiram. Para os dois grupos o genótipo G2T/G3C (UCSNP 43,19,63) estava associado a um aumento duas vezes maior para a susceptibilidade a SOP, quando comparado com todas as outras combinações de haplótipos. O risco (*odds ratio* - OR) de SOP entre o grupo branco foi 2,28 (95%IC 0,65-7,97) enquanto que no grupo de afro-americanos foi de 2,04 (95%IC 0,81-5,19). Individualmente, estes OR não alcançaram significância estatística, porém quando estas duas amostras foram analisadas juntas esta significância apareceu (OR 2,18; IC 1,06-4,45).

Resultado semelhante foi observado por Haddad e colaboradores (2002), aonde todos os participantes eram europeus, sendo predominantemente britânicos (>80%). Neste trabalho o número de mulheres com SOP era de 331 e o número da população controle era 525. Neste estudo quatro variantes do gene *CAPN10* foram avaliados, três destes foram os mesmos estudados por Erhmann (UCSNP 43, 19 e 63), o quarto (SNP 44) foi também analisado devido à sua disposição 11pb proximal ao SNP 43 e com base no seu efeito funcional na expressão do gene *CAPN10* e importante papel na susceptibilidade a DMT2 nas famílias britânicas. Todos os genótipos encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do SNP-44. Testes de locus único no estudo caso-controle não revelaram associação com os variantes. Quando foi realizada análise multilocus observou-se um forte desequilíbrio

de ligação entre os variantes ($p < 0,001$) e uma significativa redução na diversidade dos haplótipos. Igualmente como foi relatado por Erhmann, o genótipo G2T/G3C (UCSNP 43,19,63) foi observado como tendo um risco de aproximadamente 3 vezes mas para diabetes tipo II, não existindo evidência de que esta combinação de haplótipos esteja associada com um risco aumentado de SOP. (OR 0,84, IC 0,40-1,71). Esta ausência de uma evidência consistente para associação com a SOP levou Haddad e colaboradores (2002) a concluir que a variação dentro deste gene não possui um papel significativo na susceptibilidade para SOP.

Vollmert e colaboradores (2007), selecionou uma extensa amostra com oito variantes (UCSNP 44, 43, 56, ins/del 19, 110, 58, 63 e 22) do gene *CAPN10* localizado no cromossomo humano 2q37.3. Foram genotipados 146 pacientes com SOP e 606 mulheres normais para determinar quais variações no gene *CAPN10* predispunham a SOP e finalmente para elucidar as associações supostas entre *CAPN10* e SOP foi realizado uma meta-análise com base nos dados publicados de todos os estudos de genética de associação do *CAPN10* e SOP.

Os estudos atualmente existentes relacionando variabilidade genética no gene *CAPN10* e a susceptibilidade ao desenvolvimento de SOP ainda são inconclusivos, o que torna importante a realização de novos estudos buscando uma melhor caracterização molecular deste gene e a sua real relação com a SOP. Além desse fator, também é relevante a análise da variabilidade deste gene em outros grupos populacionais, para que se possa verificar se existem diferenças específicas na variabilidade relativa deste gene entre estes grupos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a variabilidade do gene *CAPN10* e a sua relação com a Síndrome do Ovário Policístico.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade genética existente em quatro marcadores distribuídos no gene *CAPN10*;
- Construir os haplótipos formados pelos alelos destes marcadores;
- Avaliar se existe associação entre estes marcadores e uma maior ou menor susceptibilidade ao desenvolvimento da SOP;
- Analisar se os haplótipos formados podem conferir predisposição ou proteção ao desenvolvimento de SOP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Constituição da amostra

No total foram coletadas amostras de sangue de 50 pacientes com SOP. Todas as pacientes apresentaram os critérios de inclusão para a doença: todas possuíam ciclos irregulares, sinais clínicos alterados, possuíam ovários policísticos visualizados por ultra-sonografia, 34% possuíam histórico de infertilidade e 28 % sofreram aborto sem causa aparente. O grupo de mulheres com SOP foi predominantemente branco (apenas uma era de origem oriental) (tabela 1). A metodologia empregada no recrutamento dos pacientes respeitou todos os critérios de seleção e obtenção de amostras e está apresentada no anexo 1. As coletas foram realizadas em pacientes com indicação de SOP da clínica Fertway Centro de Medicina Reprodutiva.

Para a composição da amostra controle foram coletados e extraídos DNA de 150 mulheres, com os critérios de exclusão para a SOP respeitados: todas possuíam ciclos regulares, não possuíam hirsutismo nem hiperandrogenismo, sem alterações clínicas, não possuíam ovários policísticos, pelo menos uma gestação e nunca sofreram aborto (critérios de seleção - anexo 1). O grupo controle foi constituído apenas por mulheres brancas. As coletas também foram realizadas na clínica Fertway Centro de Medicina Reprodutiva.

Tanto pacientes quanto controles antes de fornecer o material biológico leram e assinaram o TCLE. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC. Protocolo número 1404/2006 CEP-PUCPR, sob o título: Análise genética de região candidata a susceptibilidade a síndrome do ovário policístico (SOP).

Tabela 1. Idade e Grupo Étnico dos indivíduos analisados.

	Idade			Grupo Étnico
	Mínima	Máxima	Média	
Paciente	26	49	34,9+/-5,27	98% Brancas
Controle	22	53	35,6+/-5,79	100% Brancas

3.2 Critérios de seleção dos Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos

As regiões polimórficas analisadas foram escolhidas devido a estudos preliminares indicarem que suas frequências diferem entre as populações e podem funcionar como marcadores para análises de associação com a SOP. Estudos do gene da insulina são consistentes com a hipótese de que compartilham efeitos na susceptibilidade genética contribuindo para a coincidência fisiológica e epidemiológica entre SOP e DMT2.

Para análise genética foram selecionados os SNPs UCSNP 19 (rs3842570), 43 (rs3792267), 44 (rs2975760) e 56 (rs2975762) do gene *CAPN-10*, dentre um total de oito SNPs estudados por Vollmert e colaboradores (2007), por indicação da própria autora do estudo inicial, a qual justificou a indicação com base na posição genômica e conteúdo de informação dos marcadores (VOLLMERT, C; comunicação pessoal). O SNP-44 está localizado no intron3, o SNP-43 também está localizado neste intron (distante 11pb), o SNP-56 localiza-se no intron 4 e o SNP-19 no intron 6 (VOLLMERT et al,2007).

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue total de acordo com a metodologia descrita por John e colaboradores (1990) e modificada por Lahiri e

Nurnberger JR (1991). A técnica descrita abaixo se baseia nas seguintes etapas para a obtenção de DNA: lise das hemáceas; lise dos núcleos dos linfócitos; retirada das proteínas através da precipitação destas; precipitação do DNA; lavagem do DNA e diluição em tampão TE (0,5 ml de Tris 1 M, 0,5 ml de EDTA 0,1 M e completar com água bidestilada até 50 ml).

Em um tubo falcon de 15 ml colocou-se o creme leucocitário proveniente de 5ml de sangue e completou-se para 10ml de volume com solução TKM1 (quadro 2) e 125 µl do detergente Nonidet P-40. Inverteu-se lentamente o tubo, várias vezes, para misturar bem o detergente, e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, virando o tubo lentamente deixando o *pellet*, completou-se novamente o tubo para 10 ml de volume com solução TKM1, ressuspendeu-se o *pellet* com pipeta *pasteur* e centrifugou-se o tubo a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se delicadamente o *pellet* com micropipeta, adicionando 800 µl de solução TKM2 (quadro 2), passou-se tudo para um tubo eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 50 µl de SDS a 10%. Este material ficou encubado em banho-maria a 55°C por 20 minutos. Tirou-se do banho-maria, adicionou-se 300 µl de NaCl saturado (6M) e centrifugou-se o tubo a 12.000 rpm por 10 minutos. Virou-se o sobrenadante para um tubo de ensaio (sobrenadante contendo o DNA, precipitado contendo as proteínas) e adicionou-se 2 volumes de etanol 100% gelado. O tubo de ensaio, então, foi invertido várias vezes, até o DNA precipitar. O DNA foi “pescado” com ponteira de micropipeta com a ponta cortada, lavado com etanol 70% e transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, o qual ficou na estufa à 37°C até o restante do etanol evaporar. Ressuspendeu-se o DNA em

aproximadamente 200µl de tampão TE e este ficou no banho-maria a 55°C, por 45 minutos, e depois na geladeira por 3 dias.

QUADRO 2 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

TKM1		
Tris-HCl pH 7.6	1,0M	5,0 ml
KCl (Merck)	1,0M	5,0 ml
MgCl ₂ (Merck)	1,0M	5,0 ml
EDTA (Merck)	0,1M	10,0 ml
H ₂ O bidestilado até completar o volume de 500 ml		
TKM2		
Tris HCl pH 7.6	1,0M	0,5 ml
KCl	1,0M	0,5 ml
MgCl ₂	1,0M	0,5 ml
EDTA	0,1M	1,0 ml
NaCl	1,0M	20,0 ml
H ₂ O bidestilada até completar o volume de 50ml		

3.4 Reação em Cadeia da DNA Polimerase

A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA (SAIKI et al., 1988) e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA mediante a ação da *Taq* polimerase. Esta técnica apresenta vantagens consideráveis frente a outros métodos de análise molecular: necessita pequena quantidade de amostra, realiza-se em poucas horas e, de maneira geral, não necessita da utilização de isótopos radioativos.

Protocolo

A PCR permite a amplificação de fragmentos desde aproximadamente 50 pb até mais de 3.000 pb e, para cada fragmento de DNA que se quer amplificar, deve-se ter em conta suas características próprias, principalmente as quantidades das

período de 1 hora. Depois de realizada a corrida o gel foi corado com uma solução de 0,01% de brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml e visualizado em transiluminador. Para análise e confirmação do tamanho do produto amplificado foi aplicado também ao gel 5µl de ladder 100pb.

3.5 Análise do marcador rs3842570

Para a análise do marcador rs3842570, que é uma deleção / inserção de 32pb (um dos alelos possui duas repetições de uma seqüência de 32 nucleotídeos e o outro alelo possui três repetições), o produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%, sendo submetido a uma voltagem de 200 V por um período de aproximadamente 4 horas. Após este período o gel foi corado com nitrato de prata e os padrões foram caracterizados por comparação dos tamanhos dos fragmentos com os fragmentos presentes no ladder 100pb, que também foi aplicado no gel.

3.6 Coloração com Nitrato de Prata

A coloração com prata foi baseada na técnica descrita por Sammons (SAMMONS et al, 1981).

Protocolo

- Coloca-se o gel em um recipiente e lava-se rapidamente com dH₂O

- Retira-se a dH_2O e adiciona-se uma solução de HNO_3 a 1% (solução estoque a 65%) até que cubra o gel por um período de 3 minutos e em agitação lenta
- Retira-se a solução de HNO_3 e fazem-se duas lavagens de 15 segundos com dH_2O
- Retira-se a dH_2O e adiciona-se uma solução de AgNO_3 a 0,2% até que cubra o gel por um período de 20 minutos em agitação lenta
- Retira-se a solução de AgNO_3 e fazem-se duas lavagens de 5 seg. com dH_2O
- Retira-se a dH_2O e adiciona-se uma solução de 2,96% de Na_2CO_3 e 0,054% de formaldeído até que cubra o gel e agita-se lentamente até que a solução escureça (aproximadamente 1 minuto)
- Depois de escurecida ela é retirada e uma solução limpa, nas mesmas concentrações, é acrescentada e agita-se lentamente até que as bandas fiquem com a intensidade desejada
- Retira-se a solução de Na_2CO_3 e formaldeído e fazem-se duas lavagens de 15 segundos com dH_2O
- Retira-se a dH_2O e adiciona-se uma solução de ácido acético a 10% até que cubra o gel por um período de 5 minutos ou mais em agitação lenta
- Retira-se a solução de ácido acético e fazem-se duas lavagens de 15 segundos com dH_2O
- Retira-se a dH_2O e adiciona-se uma solução de glicerol a 5% até que cubra o gel por um período de 10 minutos em agitação lenta

3.7 Detecção de Mutações por polimorfismo conformacional de fita simples

Em condições não desnaturantes as fitas simples de DNA adotam uma conformação específica e dependente de sua seqüência de nucleotídeos, o que determina sua mobilidade eletroforética. Este fenômeno serve de base para detectar alterações de seqüência em um determinado fragmento, quando este é colocado para correr em um gel de poliacrilamida não desnaturante. A técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) foi utilizada para a análise dos marcadores rs2975760 (SNP 44), rs3792267 (SNP 43) e rs2975762 (SNP 56).

Para a análise destes marcadores, foram colocados em um tubo eppendorf de 250µl 10µl do produto de PCR e 12,5µl de tampão de corrida para SSCP (Formamida 95%; EDTA 20 mM pH 8,0; Azul de bromofenol 0,05%; Xileno cianol FF 0,05%; NaOH 10 mM). As amostras foram desnaturadas (5 minutos a 96°C), colocadas em gelo e toda a mistura foi aplicado em um gel de poliacrilamida (29:1) 10% com 5% de glicerol, sendo submetidos a uma voltagem de 250 V por um período de aproximadamente 5 horas. Após este período o gel foi corado com nitrato de prata e foram analisados os padrões obtidos por comparação com padrões previamente encontrados. A primeira vez que cada padrão era obtido, o segmento era seqüenciado para que se pudesse saber qual era a variante presente. Para o sequenciamento o fragmento a analisar foi amplificado através da PCR dentro das condições previamente descritas. Foi utilizado o seqüenciador automático 377ABI da Applied Biosystems, composto por um aparato de eletroforese, laser e computador, que recolhe e analisa os dados enviados pelo laser. Como sistema de detecção foram utilizados didesoxinucleotídeos marcados com fluorescências distintas (ET

terminator – Appliedbiosystems), que posteriormente foram recolhidas e analisadas pelos programas Collection e Analysis da Applied Biosystems.

3.8 Montagem de Haplótipos

A análise de haplótipos é fundamental quando se investiga uma associação entre diversos polimorfismos dentro de um gene e um fenótipo. Análises baseadas em haplótipos podem ajudar a diferenciar o efeito verdadeiro de um polimorfismo de um desequilíbrio de ligação com outras variantes (FRERE et al, 2006; TREGOUET et al, 2003). Os haplótipos podem servir como o melhor marcador para variantes funcionais desconhecidas do que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Quando investigamos indivíduos não relacionados, os haplótipos podem não ser deduzidos pelo genótipo. Eles são então, estatisticamente supostos. Para a confecção dos haplótipos foi utilizado o software THESIAS (*Testing Haplotype effects in Association Studies*), disponível em (<http://ecgene.net/genecanvas/news.php>). Este é um software popular utilizado para analisar associação entre os haplótipos transmitidos em indivíduos não relacionados, além de construir os haplótipos. Todos os métodos implementados no THESIAS são baseados no algoritmo Stochastic-EM (SEM) que possui a vantagem de ser mais robusto para problemas de perda de convergência que o algoritmo padrão EM.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística da frequência genotípica das amostras (pacientes e controles) foi feita por meio do Teste do χ^2 . Todos os marcadores foram submetidos

a análise do equilíbrio de Hardy e Weinberg. A análise univariada foi feita usando-se o teste exato de Fisher. Para a análise multivariada foi ajustado um modelo de Regressão Logística considerando-se a síndrome (presente ou ausente) como variável resposta e as variantes encontradas nos marcadores como variáveis explicativas, controlando-se a idade da paciente. As frequências dos haplótipos e seus erros padrões estimados dos dados genotípicos de cada locus e os efeitos dos haplótipos no fenótipo foram calculados através da utilização do software THESIAS (<http://ecgene.net/genecanvas/news.php>). O coeficiente de desequilíbrio de ligação e o coeficiente de correlação (r^2) entre os SNP foi calculado utilizando-se o programa Haploview versão 4.0 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>; Whitehead Institute for Biomedical Research). Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Idade dos participantes

Entre as pacientes a média de idade foi de 34,9 +/- 5,27 anos (idade mínima 26 e máxima 49 anos). A média de idade entre as controles foi de 35,6 +/- 5,79 anos (idade mínima de 22 anos e máxima de 53 anos).

4.2 Caracterização das variantes dos marcadores analisados

Durante a análise por SSCP dos marcadores rs2975760 (SNP 44) e rs3792267 (SNP43), que foi realizada em conjunto, foram encontrados 6 padrões distintos (Fig. 2).

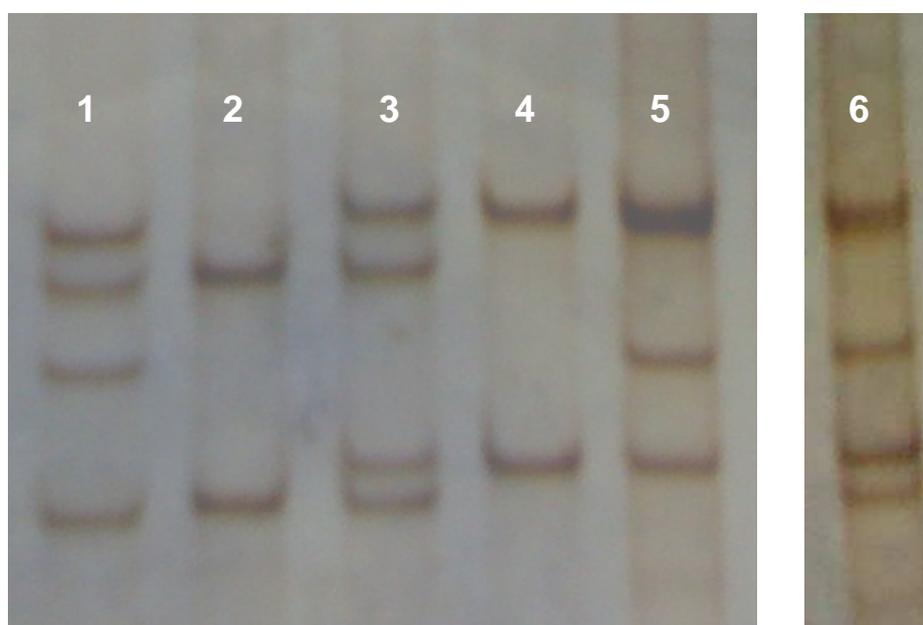


Figura 2. Padrões encontrados na análise dos marcadores rs2975760 (SNP 44) e rs3792267 (SNP43).

NOTA: Seis padrões encontrados por SSCP na análise conjunta dos marcadores rs2975760 (SNP 44) e rs3792267 (SNP43). Padrões SNP 44 / SNP43: 1: CC / GG 2: TT / GG; 3: TT / AG; 4: TT / AA; 5: TC / GG; 6: TC / AG.

Para o marcador rs2975762 (SNP 56) (analisado por SSCP) e para o marcador rs3842570 (SNP 19) foram identificados três padrões distintos para cada um deles (Fig 3 e 4, respectivamente).

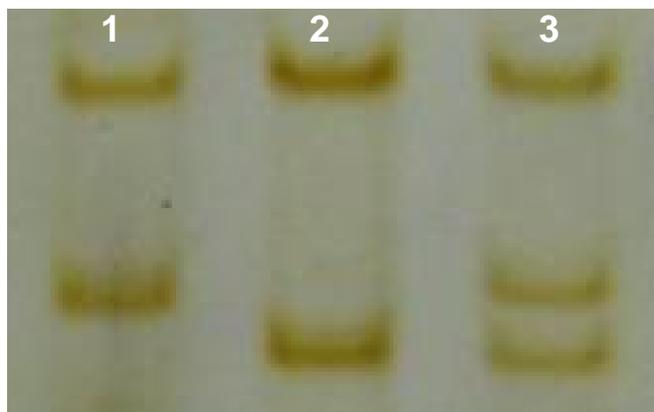


Figura 3. Padrões encontrados na análise do marcador rs2975762 (SNP 56).

NOTA: Três padrões encontrados por SSCP na análise do marcador rs2975762 (SNP 56). Coluna 1: GG; coluna 2: AA; coluna 3: AG.

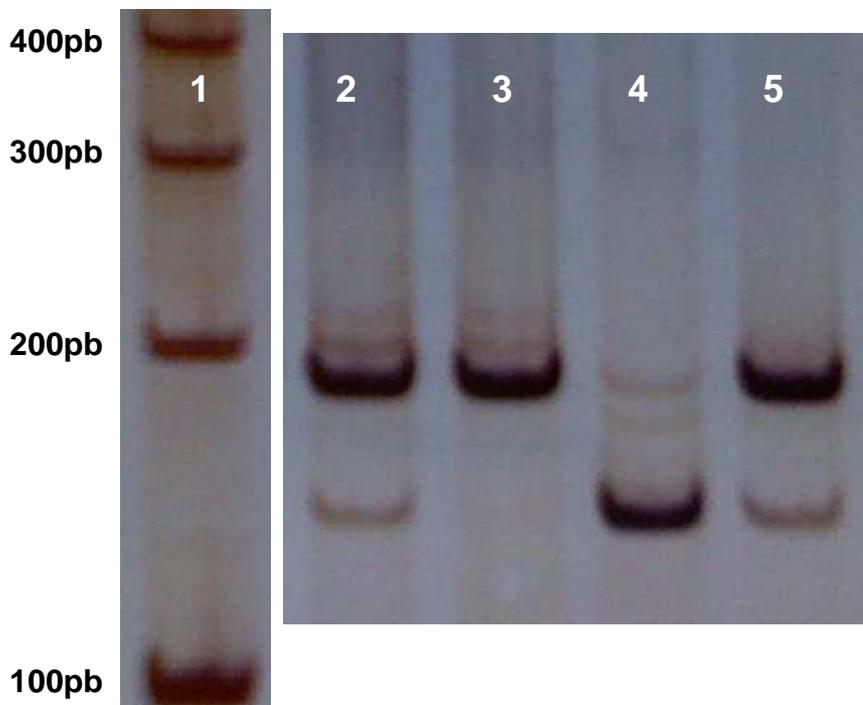


Figura 4. Padrões encontrados na análise do marcador rs3842570 (SNP 19).

NOTA: Padrões ins / del encontrados na análise do marcador rs3842570 (SNP 19). Coluna 1, ladder 100pb; colunas 2 e 5 individuo heterozigoto 2/3; coluna 3 homozigoto 3/3; coluna 4 homozigoto 2/2.

4.3 Freqüências dos marcadores analisados

O status dos polimorfismos e a freqüência dos alelos foram determinados em todos os 200 indivíduos. Em análise conjunta de todos os marcadores, eles se apresentaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 3). As freqüências gênicas e genotípicas, para as pacientes e para as controles, para os marcadores analisados podem ser vistas na tabela 4. O alelo mais freqüente encontrado foi o alelo T para o marcador rs2975760 (SNP 44 - T / C), onde a freqüência alélica observada, tanto entre as pacientes quanto entre as controles foi de 0,86, sendo que este foi o polimorfismo menos informativo.

TABELA 3 - Freqüência conjunta dos alelos para cada locus e valores de p (pacientes e controle)

	FREQUÊNCIAS GÊNICAS	P(HWE)
rs2975760 (T/C)	0,86250 / 0,13750	0,896228
rs3792267 (G/A)	0,71000 / 0,29000	0,950709
rs2975762 (A/G)	0,38500 / 0,61500	0,481869
rs3842570 (2/3)	0,39000 / 0,61000	0,287293

NOTA: p(HWE) – valor de p admitindo-se equilíbrio de Hardy e Weinberg

TABELA 4 - Distribuição gênica e genotípica para os marcadores analisados

SNP ID	UCSNP		Frequência gênica		Frequência genotípica		
			T	C	TT	TC	CC
rs2975760 T>C	44	Paciente	0,86	0,14	37(74%)	12(24%)	1(2%)
		Controle	0,86	0,14	112(74,67%)	35(23,33%)	3(2%)
rs3792267G>A	43	Paciente	0,65	0,35	21(42%)	23(46%)	6(12%)
		Controle	0,73	0,27	80(53,33%)	59(39,33%)	11(7,33%)
rs2975762 G>A	56	Paciente	0,52	0,48	13(26%)	26(52%)	11(22%)
		Controle	0,65	0,35	65(43,33%)	64(42,667%)	21(35,33%)
rs3842570 3>2	19	Paciente	0,52	0,48	13(26%)	26(52%)	11(22%)
		Controle	0,64	0,36	65(43,33%)	62(41,33%)	23(15,33%)

NOTA: SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único; SNP ID - identificação do SNP; UCSNP - SNP do gene da calpaína

4.4 Análise univariada dos marcadores

Foi realizada análise univariada para todos os marcadores, sendo que o único marcador que apresentou significância foi o rs2975762. Este resultado foi o mesmo apresentado por Vollmer e colaboradores (2007). Nas análises desenvolvidas no presente trabalho era esperado que o marcador rs3792267 também fosse significativo. Isto se deve ao fato de que quando estavam sendo analisados os haplótipos formados pelos marcadores com o software THESIAS, o software ainda analisou os quatro polimorfismos de forma independente dentro de cada haplótipo, tentando caracterizar a participação de cada um deles dentro do haplótipo. Isto é

feito para tentar caracterizar e comparar quais eram os marcadores mais significantes. Quando o marcador rs297562 G>A (SNP-56) foi analisado encontrou-se um valor de $p = 0,0008$, indicando que este seria significativo (como foi realmente mostrado pela análise univariada), porém, quando o marcador rs3792267 G>A (SNP-43) foi analisado foi encontrado um $OR = 3,01389$ (IC 1,42472-6,37566), indicando que também deveria haver um efeito deste marcador, neste caso dentro dos haplótipos TGG3 e TAG3. Este resultado não foi encontrado na análise univariada, sendo que partiu-se para uma análise multivariada tentando caracterizar uma possível influência deste marcador quando presente em genótipos específicos do marcador rs297562. Podendo funcionar como um modulador da susceptibilidade.

TABELA 5 - Freqüências genotípicas em análise univariada

SNP ID	UCSNP	Alelo	paciente	controle	p
rs2975760 T>C	44	TT	37(74%)	112(74,7%)	0,995
		TC	12(24%)	35(23,3%)	
		CC	1(2%)	3(2%)	
rs3792267G>A	43	AA	6(12%)	11(7,3%)	0,193
		AG	23(46%)	59(39,3%)	
		GG	21(42%)	80(53,3%)	
rs2975762 G>A	56	AA	11(22%)	21(14%)	0,031
		AG	26(52%)	64(42,7%)	
		GG	13(26%)	65(43,3%)	
rs3842570 3>2	19	22	11(22%)	23(15,3%)	0,089
		23	26(52%)	62(41,3%)	
		33	13(26%)	65(43,3%)	

NOTA: SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único; SNP ID - identificação do SNP; UCSNP - SNP do gene da calpaína; p – probabilidade.

4.5 Freqüências dos haplótipos formados

Em uma análise preliminar o software THESIAS analisou o número de haplótipos possíveis e suas freqüências sob equilíbrio de ligação. Nesta situação um total de 16 haplótipos seria possível. A partir deste momento o programa levou em conta possíveis desequilíbrios de ligação entre os marcadores e realizou 2501 interações. Com base nos dados encontrados foram estimados os haplótipos mais prováveis levando-se em conta desequilíbrio de ligação entre os marcadores. Um total de 6 haplótipos mais prováveis foram obtidos como resultado (tabela 6). Através dos valores das freqüências destes haplótipos o software estimou o erro padrão, o *Odds Ratio* (OR) e a significância dos haplótipos.

TABELA 6 - Freqüências de haplótipos estimadas em pacientes e controles

	haplótipos	Controles	Pacientes
Haplótipo 1	TGG3	0,373333	0,170000
Haplótipo 2	TAG3	0,266667	0,350000
Haplótipo 3	TGA2	0,216667	0,340000
Haplótipo 4	CGA2	0,136667	0,140000
Haplótipo 5	TGG2	0,003333	0,000000
Haplótipo 6	TAG2	0,003333	0,000000

4.6 Análise de associação entre os haplótipos e SOP

Após a montagem dos haplótipos o programa realizou um teste de verossimilhança para testar o efeito dos haplótipos. Em um primeiro momento com uma hipótese nula (H_0), ou seja, sem efeito dos haplótipos, e com um grau de liberdade = 1. Como resultado obteve-se um log de verossimilhança de -557,96. Com base neste valor o efeito dos haplótipos é testado. Com o acréscimo dos outros haplótipos obteve-se um valor para os graus de liberdade igual a 4. Nessa situação a log de verossimilhança ficou em -549,56, sendo que esta ficou sendo nossa hipótese alternativa (H_1), admitindo-se um efeito dos haplótipos. Testando a verossimilhança entre os 2 modelos, sem H_0 e com efeito dos haplótipos sob H_1 , através da subtração dos valores obtidos ($H_0 - H_1$) tem-se um LRT (*likelihood ratio test*) de 16,80 com um valor de $p = 0,000776929$. Com estes novos dados o programa permanece testando os efeitos dos haplótipos para verificar o efeito destes sobre a SOP.

No estudo de Vollmert e colaboradores (2007) dois haplótipos estavam significativamente associados com SOP na análise univariada. O haplótipo mais comum TGG3AGCA (frequência 22%, $p=0,0389$) abrange alelos comuns para todos os SNPs exceto para o 3 UCSNP-22. Este haplótipo mostrou um efeito protetor para a SOP (OR=0,487 $p=0,0057$). O outro haplótipo associado foi o TGA2AGCA que aumentava o risco para desenvolvimento de SOP (OR=3,557 $p=0,0011$) confirmando o resultado da análise única do SNP, que mostrava o marcador SNP ins/del 19 como importante na proteção/predisposição ao desenvolvimento da SOP.

Ao analisarmos os efeitos de associação entre os haplótipos e a SOP no presente trabalho encontramos resultados parecidos com os apresentados no trabalho de Vollmert e colaboradores (2007). O haplótipo **TGG3** também foi caracterizado como um haplótipo protetor para o desenvolvimento da doença (haplótipo mais freqüente também em nossa amostra e usado como *baseline* para análise de regressão) apresentando um OR=0,25 (IC 0,14300-0,445285) p=0,000431, sendo significativo neste sentido; e o haplótipo **TGA2** também foi caracterizado como predisponente com um OR = 3,73778 (IC 1,75935 - 7,94100) p=0,000605. Além destes dois haplótipos encontramos outro haplótipo que promovia o aumento do risco de desenvolvimento de SOP, o haplótipo **TAG3** com OR=3,01389 (1,42472-6,37566) p=0,003902. Este haplótipo está sendo descrito pela primeira vez como predisponente ao desenvolvimento de SOP.

Estes resultados de análise de haplótipos, analisados de forma conjunta aos trabalhos de Ehrmann e colaboradores (2002), Haddad e colaboradores (2002) e Vollmert e colaboradores (2007) demonstram uma real importância na susceptibilidade / proteção destes ao desenvolvimento da Síndrome do ovário policístico, resultado que não se havia atingido até então.

4.7 Análise de desequilíbrio de ligação

Através do programa Haploview 4.0 foi realizada a análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores analisados. Como resultado pode-se construir um gráfico em forma de diamante que representa o desequilíbrio de ligação entre os SNPs (figura 5). Como resultado o rs2975760 e o rs3792267 possuem um r^2 de

0,065 demonstrando a ausência de desequilíbrio entre eles. Interessante notar que são os marcadores mais próximos, estando a apenas 11pb de distância. Este resultado também pode ser observado nos outros trabalhos que analisaram estes marcadores (HADDAD et al, 2002; VOLLMERT et al, 2007). Na outra ponta do gráfico, em contrapartida, os marcadores rs2975762 e rs3842570 possuem um r^2 de 0,979 indicando um forte desequilíbrio de ligação entre eles, o que também foi observado por Vollmert e colaboradores (2007), único grupo a também analisar estes marcadores em conjunto.

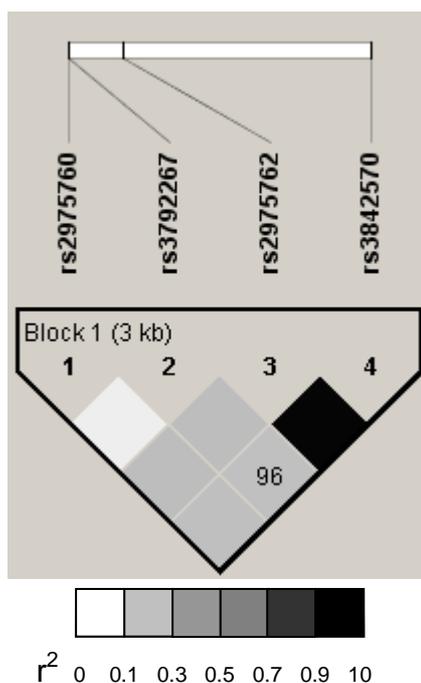


Figura 5. Desequilíbrio de ligação entre os marcadores analisados

NOTA: os quadrados indicam o desequilíbrio de ligação entre o marcador que está a esquerda e a direita. As cores representam o grau de desequilíbrio, sendo que quanto mais escuro, maior é o desequilíbrio

4.8 Análise multivariada

Através da análise pelo software THESIAS dois marcadores se mostravam associados a SOP e através de análise univariada apenas um marcador se mostrou importante. Visto isto passou-se a fazer uma análise multivariada envolvendo os dois marcadores e ajustando a amostra para a idade.

Uma possível influência do marcador rs3792267 foi encontrada quando adotamos um modelo de dominância para o alelo A no marcador rs297562, sendo que na presença de genótipos AA ou AG o marcador se mostrava como predisponente ao desenvolvimento de SOP com um OR = 2,25 (IC 1,1 - 4,6), mostrando que o resultado apresentado pelo software THESIAS estava sendo influenciado pela presença de outro marcador.

Os resultados obtidos para os modelos que se mostraram mais significativos podem ser vistos na tabela 7.

TABELA 7 - Resultados obtidos a partir de análise multivariada

		controles	pacientes	Valor de p*	OR (IC 95%)
rs3792267	AG+AA	70 (46,67%)	29 (58,00%)	0,026	2,25 (1,1 - 4,6)
	GG	80 (53,33%)	21 (42,00%)		
rs2975762	AG+AA	85 (56,67%)	37 (74,00%)	0,005	3,05 (1,4 - 6,6)
	GG	65 (43,33%)	13 (26,00%)		

NOTA: * Modelo de Regressão Logística, ajustado para idade (incluídos os marcadores rs3792267 e rs297562); OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de Confiança 95%.

5 CONCLUSÃO

- A amostra foi caracterizada clinicamente de forma bastante criteriosa, sendo que, após caracterização desta, a frequência de todos os alelos dos marcadores foi determinada nos 200 indivíduos. As frequências gênicas e genótípicas se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo mais frequente encontrado foi o alelo T para o marcador rs297560 (SNP 44 - T / C), sendo que este foi o polimorfismo menos informativo.
- Com o auxílio do software THESIAS seis haplótipos foram construídos e suas frequências foram estimadas e avaliadas tanto em pacientes quanto em controles.
- Quando realizou-se a análise dos efeitos dos haplótipos utilizando-se o OR foram encontrados dois haplótipos predisponentes para a doença que eram os haplótipos TGA2 e o haplótipo TAG3 sendo que este último foi descrito como predisponente para a SOP pela primeira vez.
- O terceiro haplótipo foi o TGG3, haplótipo mais frequente em nosso estudo e sendo utilizado como baseline para as análises de regressão, este foi considerado protetor para a doença.
- Quando realizado teste estatísticos por meio do Teste exato de Fischer ($p < 0,05$) e pelo modelo de regressão logística ajustado para a idade e incluindo os marcadores rs3792267 e rs2975762 pode-se observar que ambos apresentavam associação com a doença. O efeito do marcador rs2975762 se mostrou mais intenso, sendo o alelo A tido como predisponente e o alelo G como protetor, onde

um modelo de dominância para o alelo A no marcador rs2975762 pode ser estabelecido.

- Muitos estudos de análise de associação entre doenças e genes relacionados devem ainda ser realizadas para que se possa concluir o real papel de genes tal como a CAPN10 na susceptibilidade a SOP.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO P, SIMPSON JL. The genetics of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 18(5):707-18, 2004.

CARMINA E, AZZIZ R. Diagnosis, phenotype, and prevalence of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 86 Suppl 1:S7-8, 2006.

DASGUPTA S, REDDY BM. Present status of understanding on the genetic etiology of polycystic ovary syndrome. *J Postgrad Med*. 54(2):115-25, 2008.

DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, SPINA J, ARGYRAKOPOULOU G, PAPANASTASIOU L, BERGIELE A, PANIDIS D. Polycystic ovary syndrome: the influence of environmental and genetic factors. *Hormones*. 5(1):17-34, 2006.

DIAMANTI-KANDARAKIS E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 10(2):322 - 339, 2008.

EHRMANN D, SCHWARZ P, TANG X, HORIKAWA Y. Relationship of Calpaina-10 genotype to phenotypic features on Polycystic Ovary Syndrome. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.87(4)1669-1673. 2002.

ESSAH PA, WICKHAM EP, NESTLER JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 50(1):205-25, 2007.

FRANKS S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 333(13):853-61, 1995.

FRANKS S, GHARANI N, WATERWORTH D, BATTY S, WHITE D, WILLIAMSON R, MCCARTHY M. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 12(12):2641-8, 1997.

FRANKS S, MCCARTHY MI, HARDY K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl*. 29(1):278-85, 2006.

FRANKS S, WEBBER LJ, GOH M, VALENTINE A, WHITE DM, CONWAY GS, WILTSHIRE S, MCCARTHY MI. Ovarian morphology is a marker of heritable biochemical traits in sisters with polycystic ovaries. **J Clin Endocrinol Metab.** 2008 Jun 17. [Epub ahead of print]

FRÈRE C, TREGOUET DA, MORANGE PE, SAUT N, KOUASSI D, JUHAN-VAGUE I, TIRET L, ALESSI MC. Fine mapping of quantitative trait nucleotides underlying thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels by a transethnic study. **Blood.**108(5):1562-8, 2006.

GAASENBEEK M, POWELL BL, SOVIO U, HADDAD L, GHARANI N, BENNETT A, GROVES CJ, RUSH K, GOH MJ, CONWAY GS, RUOKONEN A, MARTIKAINEN H, POUTA A, TAPONEN S, HARTIKAINEN AL, HALFORD S, JÄRVELIN MR, FRANKS S, MCCARTHY MI. Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone. **J Clin Endocrinol Metab.** 89(5):2408-13, 2004.

GANDAR R, SPIZZO M, COLLIN D. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome. **J Gynecol Obstet Biol Reprod,** 28(6):510-8, 1999.

GONZALEZ A, ABRIL E, ROCA A, ARAGÓN MJ, FIGUEROA MJ, VELARDE P, RUIZ R, FAYEZ O, GALÁN JJ, HERREROS JA, REAL LM, RUIZ A. Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. **J Clin Endocrinol Metab.** 88(11):5529-36, 2003.

GOODARZI MO. Looking for polycystic ovary syndrome genes: rational and best strategy. **Semin Reprod Med.** 26(1):5-13, 2008.

GOVIND A, OBHRAI MS, CLAYTON RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. **J Clin Endocrinol Metab.** 84(1):38-43, 1999.

GRISONI ML, PROUST C, ALANNE M, DESUREMAIN M, SALOMAA V, KUULASMAA K, CAMBIEN F, NICAUD V, STEGMAYR B, VIRTAMO J, SHIELDS D, KEE F, TIRET L, EVANS A, TREGOUET DA. Haplotypic analysis of tag SNPs of the interleukin-18 gene in relation to cardiovascular disease events: the MORGAM Project. **Eur J Hum Genet.** 3;359(1):92-3, 2008.

HADDAD L, EVANS JC, GHARANI N, ROBERTSON C, RUSH K, WILTSHIRE S, FRAYLING TM, WILKIN TJ, DEMAINE A, MILLWARD A, HATTERSLEY AT,

CONWAY G, COX NJ, BELL GI, FRANKS S, MCCARTHY MI. Variations within the type 2 Diabetes susceptibility gene Calpain-10 in Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**.87(6):2606-2610. 2002.

HORIKAWA Y, ODA N, COX NJ, LI X, ORHO-MELANDER M, HARA M, HINOKIO Y, LINDNER TH, MASHIMA H, SCHWARZ PE, DEL BOSQUE-PLATA L, HORIKAWA Y, ODA Y, YOSHIUCHI I, COLILLA S, POLONSKY KS, WEI S, CONCANNON P, IWASAKI N, SCHULZE J, BAIER LJ, BOGARDUS C, GROOP L, BOERWINKLE E, HANIS CL, BELL GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. **Nat Genet**. 26(2):163-75, 2000.

JAKUBOWSKI L. Genetic aspects of polycystic ovary syndrome. **Endokrynol Pol**. 56(3):285-93, 2005

JOHN S W M, WEITZNER G, ROZEN R, SCRIVER C R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, 19(2): 408, 1990.

JONARD S, ROBERT Y, CORTET-RUDELLI C, PIGNY P, DECANter C, DEWAILLY D. Ultrasound examination of polycystic ovaries : is it worth counting follicles ? **Human Reproduction**. 18 : 598-603, 2003.

LAHIRI, D K; NURBERGER, J I Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. October 11;(19): 5444,1991

LUQUE-RAMIREZ M, SAN MILLAN JL, ESCOBAR-MORREALE HF. Genomic variants in polycystic ovary syndrome. **Clin Chim Acta**. 366(1-2):14-26, 2006.

MAGNOTTI M, FUTTERWEIT W. Obesity and the polycystic ovary syndrome. **Med Clin North Am**. 91(6):1151-68, 2007.

MATALLIOTAKIS I, KOURTIS A, KOUKOURA O, PANIDIS D. Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. **Arch Gynecol Obstet**. 274(4):187-97, 2006.

PASQUALI R, GAMBINERI A. Metabolic effects of obesity on reproduction. **Reprod Biomed Online**. 12(5):542-51, 2006.

PACHE TD, DE JONG FH, HOP WC, FAUSER BC. Association between ovarian changes assessed by transvaginal sonography and clinical and endocrine signs of the polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 59(3):544-9, 1993.

PORTER MB. Polycystic ovary syndrome: the controversy of diagnosis by ultrasound. **Semin Reprod Med**. 26(3):241-51, 2008.

SAGNELLA F, APA R, GUIDO M, VILLA P, SPADONI V, MICELI F, LANZONE A. Suppression and recovery of gonadotropin and steroid secretion by a gonadotropin-releasing hormone receptor antagonist in healthy women with normal ovulation versus women with polycystic ovary syndrome in the early follicular phase. **Fertil Steril**. 2008 Jun 4. [Epub ahead of print]

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 239(4839):487-91, 1988.

SAMMONS DW, ADAMS LD, NISHIZAWA, EE. Silver staining in PAGE. **Electrophoresis**. 2:135-141, 1981.

SAN MILLÁN JL, SANCHO J, CALVO RM, ESCOBAR-MORREALE HF. Role of the pentanucleotide (tttta)(n) polymorphism in the promoter of the CYP11a gene in the pathogenesis of hirsutism. **Fertil Steril**. 75(4):797-802, 2001.

SAWATHIPARNICH P, WEERAKULWATTANA L, SANTIPRABHOB J, LIKITMASKUL S. Obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome (PCOS) have more severe insulin resistance measured by HOMA-IR score than obese girls without PCOS. **J Med Assoc Thai**, 88 Suppl 8:S33-7, 2005.

SCHURING AN, SCHULTE N, SONNTAG B, KIESEL L. Androgens and insulin--two key players in polycystic ovary syndrome. Recent concepts in the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. **Gynecological and Obstetric Review**. 48(1):9-15, 2008.

SHARQUIE KE, AL-BAYATTI AA, AL-AJEEL AI, AL-BAHAR AJ, AL-NUAIMY AA. Free testosterone, luteinizing hormone/follicle stimulating hormone ratio and pelvic sonography in relation to skin manifestations in patients with polycystic ovary syndrome. **Saudi Med J**. 28(7):1039-43, 2007.

SHEEHAN, MT. Polycystic Ovarian Syndrome: Diagnosis and Management. **Clinical Medicine & Research**, V2 ; 13-27, 2004.

SIMONI M, TEMPFER CB, DESTENAVES B, FAUSER BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: polycystic ovary syndrome and ovarian response. **Hum Reprod Update**. 2008 Jul 4. [Epub ahead of print]

STEWART DR, DOMBROSKI BA, URBANEK M, ANKENER W, EWENS KG, WOOD JR, LEGRO RS, STRAUSS JF 3RD, DUNAIF A, SPIELMAN RS. Fine mapping of genetic susceptibility to polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2 and tests for regulatory activity. **J Clin Endocrinol Metab**. 91(10):4112-7, 2006.

THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Hum Reprod**. 19(1):41-7, 2004.

URBANEK M, LEGRO RS, DRISCOLL DA, AZZIZ R, EHRMANN DA, NORMAN RJ, STRAUSS JF 3RD, SPIELMAN RS, DUNAIF A. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome ; Strong evidence for linkage is with follistatin. **Genetics** ; 96 : 8573-8578, 1999.

URBANEK M, WU X, VICKERY KR, KAO LC, CHRISTENSON LK, SCHNEYER A, LEGRO RS, DRISCOLL DA, STRAUSS JF 3RD, DUNAIF A, SPIELMAN RS. Allelic variants of the Follistatin gene in Polycystic Ovary Syndrome. **The journal of clinical Endocrinology & Metabolism**. 85(12): 4455-4461, 2001.

URBANEK M, WOODROFFE A, EWENS KG, DIAMANTI-KANDARAKIS E, LEGRO RS, STRAUSS JF 3RD, DUNAIF A, SPIELMAN RS. Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. **J Clin Endocrinol Metab**. 90(12):6623-9, 2005.

URBANEK M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**. 3(2):103-11, 2007.

URBANEK M, SAM S, LEGRO RS, DUNAIF A. Identification of a polycystic ovary syndrome susceptibility variant in fibrillin-3 and association with a metabolic phenotype. **J Clin Endocrinol Metab**. 92(11):4191-8, 2007.

VAN SANTBRINK EJ, HOP WC, FAUSER BC. Classification of normogonadotropic infertility: polycystic ovaries diagnosed by ultrasound versus endocrine characteristics of polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 67(3):452-8, 1997.

VOLLMERT C, HAHN S, LAMINA C, HUTH C, KOLZ M, SCHÖPFER-WENDELS A, MANN K, BONGARDT F, MUELLER JC, KRONENBERG F, WICHMANN HE, HERDER C, HOLLE R, LÖWEL H, ILLIG T, JANSSEN OE; THE KORA GROUP. Calpain 10 variants and haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in Caucasians. **Am J Physiol Endocrinol Metabolism**. 292 : 836-844 2007.

WANG Y, WU X, CAO Y, YI L, CHEN J. A microsatellite polymorphism (tttta)_n in the promoter of the CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 86(1):223-6, 2006.

WILTGEN D, FURTADO L, KOHEK MB, SPRITZER PM. CAPN10 UCSNP-43, UCSNP-19 and UCSNP-63 polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**. 23(3):173-8, 2007.

WOOD JR, HO CK, NELSON-DEGRAVE VL, MCALLISTER JM, STRAUSS JF 3RD. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. **J Reprod Immunol**. 63(1):51-60, 2004.

ZAWADSKI JK, DUNAIF A. **Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome**. In: Givens J, Haseltine F, Merriman G, eds. The polycystic ovary syndrome. Cambridge, MA: Blackwell Scientific; 1992. p.377–384

ANEXO 1

Critérios para seleção das amostras.

1) Critérios para seleção das amostras Controle:

1.1) Analisar o histórico da paciente (Anamnese) Observações: _____

1.2) Separar pacientes de acordo com :

1.2.1) Idade : < 20; 20-24; 25-29; 30-34; 35-39; > 40.

1.2.2) Número de gestações: 1 2 3 +4

1.2.3) Não possuir nenhuma das características abaixo relacionadas :

Ciclos irregulares Sim Não

Hirsutismo Sim Não

Hiperandrogenismo Sim Não

Ovários Policísticos Sim Não

2) Critérios para selecionar amostras de pacientes com SOP:

2.1) Analisar o histórico da paciente (Anamnese) Observações: _____

2.2) Separar pacientes de acordo com :

2.2.1) Idade : < 20; 20-24; 25-29; 30-34; 35-39; > 40.

2.2.2) Possui Oligo e/ou Anovulação ? Sim Não Especificar: _____

2.2.3) Possui sinais clínicos e bioquímicos de hiperandrogenismo ? Sim Não

Especificar: _____

2.2.4) Possui Ovários policísticos ? (presença de > 12 ou mais folículos medindo de 2-9 mm em cada ovário) Sim Não Especificar: _____

2.2.5) Problemas de infertilidade ? Sim Não Especificar: _____

2.2.6) Peso : _____

2.2.7) Abortos? Sim Não Quantos: _____

2.2.8) Outras Etiologias Sim Não Especificar : _____

3) Após análise da Anamnese das pacientes e do grupo controle, foi feita a primeira abordagem no sentido de explicar o motivo da pesquisa e o motivo da solicitação de participação.

4) Após a aceitação pela paciente para participar da pesquisa lhe foi entregue o termo de consentimento informado para que seja lido e assinado.

5) A coleta da amostra foi feita na clínica mediante entrega do termo de consentimento.