



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Tayssia Beatriz dos Santos

Polimorfismos nos genes do metabolismo do folato
em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos

UBERABA-MG

2017

Tayssia Beatriz dos Santos

Polimorfismos nos genes do metabolismo do folato
em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela
Torreglosa Ruiz Cintra.

UBERABA-MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S239p Santos, Tayssia Beatriz dos
Polimorfismos nos genes do metabolismo do folato em mulheres
com síndrome dos ovários policísticos / Tayssia Beatriz dos Santos.
-- 2017.
109 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas)
-- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Torreglosa Ruiz Cintra

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Ácido fólico. 3. Polimorfismo
genético. I. Cintra, Mariangela Torreglosa Ruiz. II. Universidade Federal
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.11

TAYSSIA BEATRIZ DOS SANTOS

Polimorfismos nos genes do metabolismo do folato
em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interdisciplinar em
Biotecnologia Aplicada, da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências com ênfase em
Produtos Naturais e Sintéticos.

Uberaba, 04 de Abril de 2017.

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Mariângela Torreglosa Ruiz-Cintra - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Profa. Dra Joice Matos Biselli
Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto



Prof. Dr. André Luiz Pedrosa
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedicatória

Dedico primeiramente a Deus, fonte da minha fé e permitir o conhecimento de sua Obra. Aos meus pais Antônio Sérgio e Elci e minha irmã Tassiana por serem o alicerce da minha vida. Ao meu Mô, João Ricardo, pelo companheirismo durante esta caminhada. Aos familiares e amigos, pelo apoio e carinho dados.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos Amigos (Espíritos Superiores), pela fé, força e sabedoria dados para que eu chegasse até aqui e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, e assim poder seguir essa jornada com harmonia.

Aos meus amados pais Antônio Sérgio e Elci, obrigada por serem a base da nossa família. Os senhores foram, são e sempre serão minha fonte de inspiração e perseverança, pois com os seus exemplos, me fazem acreditar que tudo que desejo, com dedicação e esforço, eu consigo! Minha querida irmã Tassiana obrigada por ser minha cúmplice em todos os momentos, e pelo apoio e ajuda nas horas que mais precisei. Você, o Papai e a Mamãe sempre serão os meus eternos amores. Obrigada pelo amor incondicional! Amo vocês!

Ao meu namorado João Ricardo, obrigada ter sido um verdadeiro companheiro, estando ao meu lado nos bons e maus momentos, sempre me escutando, aconselhando, e ajudando em tudo que estava em seu alcance. Te amo Môm!

Aos meus amigos, familiares e todas as pessoas que torceram para que tudo ocorresse bem, meu muito obrigada!

A minha orientadora, Profa. Dra. Mariangela Torreglora Ruiz-Cintra, meus sinceros agradecimentos pela dedicação e paciência ao qual conduziu esse trabalho. Sempre querendo que eu aproveitasse cada instante e oportunidade dentro do mestrado para adquirir os conhecimentos necessários para meu crescimento pessoal e acadêmico. A palavra GRATIDÃO é pouco diante aos seus dedicados momentos na minha orientação, mas obrigada por fazer parte desse meu objetivo de vida. Que Deus e Nossa Senhora sempre abençoe seus dias.

A Profa. Dra Marly Aparecida Spadotto Balarin, agradeço pelo carinho e toda colaboração no desenvolvimento desse trabalho, acreditando em meu potencial. A Senhora me fez crer que existe mais que resultados atrás de uma pesquisa, há humanização com o estudante e o estudado. Obrigada pelos ensinamentos e afetividade!

As professoras Dra. Alessandra B. T. de Marqui e M^a. Roseanne L. S. Grecco obrigada por toda disposição e disponibilidade na elaboração desse estudo, sempre compartilhando suas experiências e conhecimentos.

A Profa. Dra. Patrícia A. A. Buranello, obrigada pelo suporte e colaboração no pouco tempo que lhe coube sob minha orientação, quando a Profa. Dra. Mariangela estava em licença maternidade.

Aos médicos que fizeram parte do meu Mestrado, Professores Doutores: Elisabete A. Mantovani R. de Rezende, Marco Fábio P. Lima e Mariana Kefalas O. Gomes, meu muito obrigada por permitir minha presença nos ambulatórios no qual são responsáveis e também por nunca negarem avaliar as mulheres desse estudo. A todos os Médicos, Residentes e Funcionários dos ambulatórios que passei, obrigada por cooperarem com esse trabalho.

A todas as mulheres que quiseram participar desse estudo e colaborar com o avanço da ciência. Vocês merecem meu eterno agradecimento!

Aos meus mais novos amigos e funcionários do laboratório da Disciplina de Genética da UFTM: Christiane, Elaine, Gustavo e Ricardo, obrigada pela amizade e diversas maneiras com a qual contribuíram com minha jornada no Mestrado.

Meus agradecimentos à Andrezza Cancian, Helena Korres, Mariana Mendes, Mariana Teixeira e Sarah Tanaka, companheiras de pesquisa e por tornarem minha caminhada mais leve e alegre. Espero ter vocês presentes em minha vida, mesmo depois de finalizada essa etapa. Aos outros alunos que também passaram no laboratório de Genética, obrigada pelo apoio e incentivo dados.

Ao meu amigo Evaldo Maia, obrigada pela ajuda nas inúmeras coletas de sangue e também pela amizade.

À Professora Dra. Ana Paula Sarreta Terra, obrigada por ser uma grande incentivadora do meu ingresso no mestrado.

Aos meus colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas da UFTM, obrigada por colaborarem de forma direta ou indireta na concretização da minha pós-graduação.

Aos membros participantes da minha banca examinadora, obrigada pela contribuição dada na construção do meu conhecimento científico.

Agradeço a UFTM, pela oportunidade de realizar o pós-graduação nessa instituição.

À FAPEMIG, muito obrigada pelo apoio financeiro, sem esse incentivo seria impossível a concretização desse projeto.

Finalizo meus agradecimentos com apenas um desejo: que Deus abençoe todas as pessoas que diretamente ou indiretamente colaboraram na construção do meu saber científico e progresso pessoal.

Επίγραφε

“Uma mente que se alarga ao conhecimento,
jamais retorna ao seu estado original”.

Albert Einstein

“Não são as espécies mais fortes que
sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim
as mais suscetíveis a mudanças.”

Charles Darwin

Resumo

RESUMO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é uma patologia endocrinológica, caracterizada por oligoanovulação e/ou anovulação, ovários policísticos e hiperandrogenismo. Os polimorfismos nos genes da via do metabolismo do folato podem ocasionar mudanças nos padrões de metilação do DNA e assim alterar a regulação da expressão gênica. Além disso, essas variações genéticas também podem causar hiperhomocisteinemia e levar a distúrbios metabólicos, como dislipidemia, hiperlipidemia, resistência insulínica e doenças cardiovasculares, consequências clínicas da SOP. O objetivo deste estudo foi investigar as variantes genéticas do metabolismo do folato (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *RFC-1* A80G), relacionadas com o desenvolvimento da SOP. A casuística incluiu 203 mulheres, 99 com SOP e 104 controles. As genotipagens foram realizadas por meio da técnica de PCR-RFLP. A análise estatística foi realizada por análises descritivas, análise univariada e modelo de regressão logística. Os resultados foram apresentados em *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). Foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A distribuição da frequência genotípica do polimorfismo A80G no gene *RFC-1* apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,01$). O haplótipo T-C dos polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR* também apresentou diferença entre os grupos ($p=0,042$), com maior frequência no grupo controle. Na análise de modelos de herança, houve diferenças entre os grupos para o modelo Recessivo do polimorfismo A66G no gene *MTRR* ($p=0,035$) e os modelos de Codominância e Sobredominância do polimorfismo A80G no gene *RFC-1* ($p=0,049$ e $p=0,017$, respectivamente). Os homocigotos polimórficos (GG) do polimorfismo A66G no gene *MTRR* e os heterocigotos (AG) do polimorfismo A80G no gene *RFC-1* apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, com maior frequência nos indivíduos controles. A análise multivariada evidenciou que histórico de SOP familiar está mais frequentes em SOP, e não houve associação entre os polimorfismos estudados e SOP. Na casuística estudada, o polimorfismo A80G no gene *RFC-1* mostra diferenças entre casos e controles. O haplótipo T-C do gene *MTHFR*, o homocigoto polimórfico do polimorfismo *MTRR* A66G e o heterocigoto do polimorfismo *RFC-1* A80G podem estar associados à fatores de proteção para a doença. Entre os fatores de risco para a síndrome, o

histórico de SOP familiar apresentam mais frequentes entre as mulheres com a síndrome.

Palavras chaves: Síndrome do Ovário Policístico. Ácido Fólico. Polimorfismo Genético.

Abstract

ABSTRACT

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrinological pathology characterized by oligo-anovulation and/or chronic anovulation, polycystic ovary and hyperandrogenism. The genetic polymorphisms of folate metabolism pathways can cause changes in the DNA methylation patterns and alter the regulation of gene expression. Furthermore, these genetic variations can cause hyperhomocysteinemia and can also lead to metabolic disorders such as dyslipidemia, hyperlipidemia, insulin resistance and cardiovascular diseases, which are clinical consequences of PCOS. The aim of this study was to investigate the genetic variants of the folate metabolism (*MTHFR* C677T; *MTHFR* A1298C; *MTR* A2756G; *MTRR* A66G and *RFC-1* A80G) related with development of PCOS. The casuistic of this study included 203 women, 99 with PCOS and 104 controls. The genotyping was performed by PCR-RFLP. The statistics analyses were performed by descriptive analyses, univariate analyses and logistic regression model. The results were presented in *odds ratio* (OR) and confidence interval of 95% (CI-95%), with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). The univariate analyses of genotypic distribution of the *RFC-1* A80G polymorphism showed significant difference between the two groups ($p=0.01$). The T-C haplotype *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms showed significant difference between the groups ($p=0.042$), which is more frequent in the control group. There were differences between the groups in the recessive model of the *MTRR* A66G polymorphism ($p=0.035$) and codominant and overdominant models of the *RFC-1* A80G polymorphism ($p=0.049$ and $p=0.017$, respectively). The polymorphic homozygous (GG genotype) of *MTRR* A66G polymorphism and heterozygous (AG genotype) of *RFC-1* A80G polymorphism showed statistic difference between the groups, which are most frequent in controls. The multivariate analysis evidenced that family history of PCOS is more frequent in the PCOS group ($p=0.003$) and there was no association between the polymorphisms studied and PCOS. In the sample studied, the *RFC-1* A80G polymorphism shows differences between the cases and controls. The haplotype T-C C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR* gene, the polymorphic homozygous of *MTRR* A66G polymorphism gene and heterozygous of *RFC-1* A80G polymorphism gene can be associated with protective factors for the disease. About the risk factors for the syndrome, the history of familial PCOS is more frequent between women with the syndrome.

Key words: Polycystic Ovary Syndrome. Folic Acid. Polymorphism.

Lista de
Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do Metabolismo do Folato e suas principais enzimas.....	42
Figura 2 - Desenho esquemático do cromossomo 1. A seta em vermelho indica a posição cromossômica do gene <i>Metilenoetetrahidrofolato redutase (MTHFR)</i> nesse cromossomo -1p36.3.....	45
Figura 3 - Desenho esquemático do cromossomo 1. A seta em vermelho indica a posição cromossômica do gene <i>Metionina sintase (MTR)</i> nesse cromossomo -1q43.....	47
Figura 4 - Desenho esquemático do cromossomo 5. A seta em vermelho indica a posição cromossômica do gene <i>Metionina sintase redutase (MTRR)</i> nesse cromossomo -5p15.3.....	47
Figura 5 - Desenho esquemático do cromossomo 21. A seta em vermelho indica a posição cromossômica do gene <i>Carreador de folato reduzido 1(RFC-1)</i> nesse cromossomo - 21q22.3.....	48
Figura 6 - Foto representativa do gel de poliacrilamida 10% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene <i>MTHFR C677T</i>	61
Figura 7 - Foto representativa do gel de poliacrilamida 10% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene <i>MTHFR A1298C</i>	63
Figura 8 - Foto representativa do gel de agarose 3% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene <i>MTR A2756G</i>	64
Figura 9 - Foto representativa do gel de poliacrilamida 12% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene <i>MTRR A66G</i>	65
Figura 10 - Foto representativa do gel de poliacrilamida 10% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene <i>RCF-1 A80G</i>	67

Lista de
Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Condições para diagnóstico de SOP segundo cada Consenso....	33
Quadro 2 -	Genes associados aos estudos em SOP.....	40
Quadro 3 -	Principais enzimas participantes no metabolismo do folato.....	42
Quadro 4 -	Estudos de Caso-Controle de polimorfismos do gene <i>MTHFR</i> e SOP.....	45
Quadro 5 -	Reagentes usados no preparo da Solução C.....	55
Quadro 6 -	Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR, sequências dos primers, tamanho dos produtos de PCR e temperatura de anelamento dos polimorfismos estudados.....	58
Quadro 7 -	Condições utilizadas nas reações de restrição enzimática e o tamanho dos fragmentos gerados após o corte enzimático.....	59

Lista de
Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do grupo de estudo composto por mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP).....	52
Tabela 2 - Quantificação dos exames laboratoriais do grupo de estudo, composto por mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP), com alterações a partir dos valores de referência.....	53
Tabela 3 - Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para o polimorfismo do gene <i>MTHFR</i> C677T.....	62
Tabela 4 - Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para o polimorfismo do gene <i>MTHFR</i> A1298C.....	63
Tabela 5 - Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para o polimorfismo do gene <i>MTR</i> A2756G.....	64
Tabela 6 - Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para o polimorfismo do gene <i>MTRR</i> A66G.....	66
Tabela 7 - Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para o polimorfismo do gene <i>RFC-1</i> A80G.....	67
Tabela 8 - Frequência dos haplótipos dos polimorfismos C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> das mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP).....	68
Tabela 9 - Associação dos polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTR</i> A2756G, <i>MTRR</i> A66G e <i>RFC-1</i> A80G com SOP, ajustado para a Idade.....	69
Tabela 10 - Distribuição de fatores de riscos para SOP e os polimorfismos estudados de mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP).....	70

Lista de
Abreviaturas,
Síglas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

χ^2	Qui-quadrado
μL	Microlitro
17- OHP	17 α -Hidroxiprogesterona
5 – MTHF	5-Metiltetrahidrofolato
5,10 - MTHF	5,10-Metilenotetrahidrofolato
A	Adenina
AES-PCOS	<i>Androgen Excess Society - Polycystic Ovary Syndrome</i>
AMH	<i>Antimullerian Hormone</i> / Hormônio Antimulleriano
ATP	Trifosfato de Adenosina
C	Citosina
Ca	Cálcio
CH ₃	Grupo Metil
CSOP	Controle para Síndrome dos Ovários Policísticos
DHFR	Dihidrofolato Redutase
dL	Decilitro
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
dTMP	Timidina monofosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EDCs	<i>Endocrine-disrupting chemicals</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-Acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ESHRE/ASRM	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology/</i> <i>American Society Reproduction Medicine</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Guanina
g	Gramas
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hospital de Clínicas
Hcy	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
I.C.	Intervalo de Confiança
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à Insulina-1
INSL3	<i>Insulin-like factor 3</i> / Fator 3 semelhante à insulina
IMC	Índice de Massa Corporal
K	Potássio
Kg	Quilograma
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
L	Litro
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
m	Metro
M	Molar
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
microRNAs	micro Ácido Ribonucléico

min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTHFD1	Metilenotetrahidrofolato Desidrogenase 1
MTFHR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
MTR	Metionina Sintase
MTRR	Metionina Sintase Redutase
n°	Número
n	Número de mulheres com presença da variável analisada
N	Número do total de mulheres com a variável analisada
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
ND	Produto de PCR Não Digerido
ng	Nanograma
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
O.R.	<i>Odds Ratio</i>
P	Fósforo
p	probabilidade de significância
pb	Pares de Bases
PCBs	<i>Polychlorinated biphenyls</i> Bifenilos policlorados
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismos de Comprimento: de Fragmentos de Restrição
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
pmol	Picomoles
RFC-1	Carreadora de Folato Reduzido 1
RI	Resistência Insulínica
RPL	<i>Reccurent Pregnancy Loss</i>
rpm	rotação por minuto
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SDHEA	Sulfato de Deidroepiandrosterona
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SHBG	<i>Sex Hormone-binding Globulin/</i> Globulina Ligante de Hormônio Sexual
SHMT	Serina Hidroximetiltransferase
SM	Síndrome Metabólica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism/</i> Polimorfismo de Nucleotídeos Únicos
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
T	Timina
TAE	Tris Acetato EDTA
TD	Produto de PCR Totalmente Digerido
TE	Tris-EDTA
TGF-β	<i>Transforming growth factor – beta /</i> Fator de transformação do crescimento-beta

TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
THF	Tetrahidrofolato
Tris-HCl	<i>Tris Hydrochloride</i>
TS	Timidilato Sintase
TSH	Hormônio Tireoestimulante
U	Unidade
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A /</i> Fator de crescimento endotelial vascular A
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	DESENVOLVIMENTO	32
2.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	33
2.1.1	Síndrome dos ovários policísticos	33
2.1.2	Comorbidades associadas à SOP	36
2.1.3	SOP: uma doença multifatorial	38
2.1.4	Metabolismo do ácido fólico	40
2.1.5	Polimorfismos genéticos das enzimas do metabolismo do folato e SOP	43
2.1.6	Polimorfismos genéticos e biomarcadores	48
2.2	JUSTIFICATIVA.....	49
2.3	OBJETIVOS.....	50
2.3.1	Objetivo geral	50
2.3.2	Objetivos específicos	50
2.4	CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	51
2.4.1	Considerações éticas	51
2.4.2	Casuística	51
2.4.3	Crítérios de exclusão	51
2.4.4	Coleta dos dados	52
2.4.5	Coleta de sangue e separação dos Leucócitos	54
2.4.6	Extração DNA genômico	54
2.4.7	Quantificação e Diluição das amostras de DNA	55
2.4.8	Análises Moleculares	56
2.4.9	Análises Estatística	59
2.5	RESULTADOS.....	61
2.5.1	Análise do polimorfismo do gene <i>MTHFR</i> C677T (rs 1801133) ...	61
2.5.2	Análise do polimorfismo do gene <i>MTHFR</i> A1298C (rs 1801131)	62
2.5.3	Análise do polimorfismo do gene <i>MTR</i> A2756G (rs 1805087)	64
2.5.4	Análise do polimorfismo do gene <i>MTRR</i> A66G (rs 1801394)	65
2.5.5	Análise do polimorfismo do gene <i>RFC-1</i> A80G (rs 1051266)	66
2.5.6	Análise do Haplótipo do gene <i>MTHFR</i>	68
2.5.7	Análise de associação dos polimorfismos estudados	68
2.5.8	Análise da Regressão Logística Múltipla	70
2.6	DISCUSSÃO.....	72
3	CONCLUSÃO	80
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
5	ANEXOS E APÊNDICES	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) foi descrita em 1935 pelos médicos Leventhal e Stein, pela observação de mulheres que apresentaram um quadro de amenorreia e ovários policísticos (NANDI et al, 2014), e atualmente é uma das endocrinopatias mais comuns nas mulheres em idade reprodutiva (COWAY et al, 2014). Sua etiologia não está totalmente elucidada e estudos demonstram um padrão de herança multifatorial (DIAMANTI-KANDARAKIS et al, 2006; DUMESIC et al, 2015; MERKIN et al, 2016; JONES; GOOZARDI, 2016).

As mulheres com SOP apresentam risco aumentado para diversas doenças, determinadas pelos distúrbios hormonais que se apresentam na síndrome. Vários estudos já demonstraram que mulheres com a síndrome podem desenvolver distúrbios metabólicos (HUANG; COVIELLO, 2012; de LEO et al, 2016), obesidade (LIM et al, 2012; CHEN et al, 2013, ORIO et al, 2016), *diabetes mellitus* (DM) (CHEN et al, 2013; SIRMANS; PATE, 2014, ORIO et al, 2016), infertilidade, adenocarcinoma de endométrio (BARTHELMESS; NAZ, 2014), complicações obstétricas (PALOMBA et al, 2015) e também doenças cardiovasculares (KAO et al, 2013; NANDI et al, 2014, ORIO et al, 2016).

Modificações na funcionalidade de vias metabólicas podem desempenhar papel relevante no desenvolvimento da SOP e alterações na via metabólica do folato podem estar implicados na etiologia ou prevalência da síndrome, principalmente pela decorrência de mudanças epigenéticas, como os padrões de metilação do DNA (LI; HUANG, 2008; XU et al, 2011; ILLIE; GEORGESCOU, 2015; YU et al, 2015; PRUKSANANONDA et al, 2016) e a elevação de homocisteína que pode levar à hiperhomocisteinemia (BADAWY et al, 2007; PALEP-SINGH et al, 2008; SALEHPOUR et al, 2011; SEN et al, 2011).

O folato é uma vitamina do complexo B e atua em vários processos fisiológicos, como síntese de purinas e pirimidinas, síntese de aminoácidos e processo de metilação (KANDI; VADAKEDATH, 2015; DESAI et al, 2016).

Polimorfismos nos genes que codificam as enzimas do metabolismo do folato podem estar implicados no desenvolvimento de várias disfunções no organismo, principalmente em decorrência das alterações de metilação do DNA (GALBIATTI et al, 2012; KANDI; VADAKEDATH, 2015) e hiperhomocisteinemia (ROZYCKA et al,

2013; NAZKI et al, 2014; PETRAS et al, 2014) e assim contribuem nas manifestações clínicas na SOP.

Considerando a relevância do papel das enzimas envolvidas no metabolismo do folato e a influência das alterações dessa via metabólica em SOP, tornam-se importante estudos de investigação de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) na doença. A partir das evidências apresentadas, este estudo teve como objetivo identificar os polimorfismos genéticos do metabolismo do folato (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *RFC-1* A80G) em SOP e uma população controle.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFTM sob número de protocolo 1796. O estudo teve a participação de 203 mulheres (99 com SOP e 104 controles). Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos por meio um questionário realizado com as pacientes, e os exames laboratoriais por meio da consulta aos prontuários médicos. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico, e as genotipagens foram realizadas por meio da técnica de PCR-RFLP. A análise estatística foi realizada por meio de análise descritiva, univariada e de regressão logística. O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Os SNPs podem ser bons indicadores biológicos (biomarcadores) na avaliação de alterações estruturais ou funcionais do organismo influenciando na etiologia ou patogênese de doenças (SAAD et al, 2016; RATHER, DHAWAN, 2016).

Existem poucos estudos das variantes do genes do metabolismo do folato em SOP. E na população brasileira, ainda não há na literatura relatos de trabalhos sobre esse tema. Portanto, as modificações epigenéticas do DNA e hiperhomocisteinemia podem estar associadas com a etiologia, manifestações clínicas ou com as patologias associadas à SOP, e assim interferindo na saúde e na vida da mulher.

Portanto, a avaliação desses polimorfismos podem auxiliar no entendimento de como os fatores genéticos podem influenciar na etiologia e/ou patogênese da síndrome, e ainda colaborar na prevenção e diagnóstico através de possíveis biomarcadores para a doença.

Desenvolvimento

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é uma patologia endocrinológica que acomete mulheres em idade reprodutiva (COWAY et al, 2014), e foi descrita em 1935 pelos médicos americanos Irving Freiler Stein e Michael Leo Leventhal, onde foi observado o quadro de amenorreia e ovários policísticos (NANDI et al, 2014).

Entretanto, somente em 1990 o Instituto Nacional de Saúde, nos Estados Unidos (NIH), estabeleceu que o diagnóstico de SOP deveria ser baseado na presença de disfunção menstrual e hiperandrogenismo. Já em 2003, no Consenso de Rotterdam, pesquisadores europeus e americanos das Sociedades de Reprodução e Embriologia Humana da Europa e de Medicina Reprodutiva dos Estados Unidos (ESHRE/ASRM) expandiram os critérios para o diagnóstico de SOP para pelo menos duas de três condições: 1) oligoanovulação ou anovulação; 2) hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico e; 3) ovários policísticos definidos pelo ultrassom, levando em consideração a exclusão de algumas endocrinopatias (DUMESIC et al, 2015; PASQUALI et al, 2016). De acordo com os Critérios de Rotterdam, os ovários policísticos são uma das condições isoladas no diagnóstico da SOP. A AES-PCOS (do inglês: *Androgen Excess Society – Polycystic Ovary Syndrome*) em 2006, publicou que a hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo clínico seriam critérios obrigatórios, estabelecendo que para o diagnóstico de SOP são necessários as seguintes condições: 1) oligoanovulação e/ou anovulação ou ovários policísticos e 2) hiperandrogenismo clínico ou bioquímico (MARCONDES et al, 2011). O Quadro 1 sumariza os critérios de diagnóstico de SOP de acordo com os Consensos já realizados.

Quadro 1- Condições para diagnóstico de SOP segundo cada Consenso.

NIH 1990	ESHRE/ASRM 2004	AES-PCOS 2006
1)Disfunção Menstrual 2)Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico*	1)Disfunção Menstrual 2)Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico* 3)Ovários Policísticos	1)Disfunção Menstrual 2)Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico** 3)Ovários Policísticos

* Exclusão de outras doenças que apresentam hiperandrogenismo; ** Condição clínica essencial para diagnóstico da síndrome.

Fonte: Moura et al, 2011.

Atualmente, o Consenso de Rotterdam continua sendo o mais utilizado na clínica médica para diagnóstico da síndrome e considera a análise dos seguintes parâmetros: oligoanovulação e/ou anovulação crônica, hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico e presença de ovários policísticos visualizados em ultrassonografia (ROTTERDAM, 2004; MOURA et al, 2011; NANDI et al, 2014).

A oligoanovulação ou anovulação crônica em SOP é manifestada por oligoamenorreia (menos que nove ciclos anuais) ou amenorreia (ausência de menstruação). A disfunção da menstruação pode ser causada a partir de estimulação de estrogênio sem oposição e falta de progesterona devido anovulação (TRIKUDANATHAN, 2015). Em contrapartida, uma minoria de mulheres podem apresentar ovulação, anormalidades androgênicas e distúrbios metabólicos menos intensos, caracterizando uma variante da síndrome denominada SOP ovulatória. Cabe salientar que em adolescentes, alterações menstruais e ciclos anovulatórios são comuns, podendo estar presentes em até 65% das garotas (MARCONDES et al, 2011).

Os sinais clínicos do hiperandrogenismo são caracterizados por hirsutismo, acne, oleosidade de pele ou cabelo, em alguns casos alopecia androgênica (TRIKUDANATHAN, 2015). O hiperandrogenismo bioquímico é avaliado por exames laboratoriais para confirmação de excesso de hormônios androgênicos, como testosterona livre, globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG, do inglês *Sex hormone-binding globulin*, sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), androstenediona (DUMESIC et al, 2015). Cerca de 60% a 80% de mulheres com SOP apresentam taxas elevadas de andrógenos, no qual a testosterona livre possui maior representatividade entre os outros hormônios e SDHEA pode estar elevado em 25% das mulheres com a síndrome (MARCONDES, 2011).

Os ovários policísticos são analisados por exame de ultrassonografia e determinados pela presença de 12 ou mais folículos, medindo aproximadamente de 2 a 9 milímetros de diâmetro ou aumento do volume ovariano maior que 10 mL (ROTTERDAM, 2004). O início da fase folicular do ciclo (terceiro ao quinto dia do ciclo) é o mais indicado para realização do exame ultrassonográfico, quando as pacientes apresentam ciclo regular. Para as pacientes com disfunção menstrual, o exame pode ser realizado aleatoriamente ou posterior a 3 ou 5 dias de sangramento induzido por medicamento hormonal. Em relação ao diagnóstico de SOP por exame radiológico dos ovários policísticos, duas condições devem ser levadas em conta,

aproximadamente 20% das mulheres com a síndrome não apresentam alterações ao exame ultrassonográfico; e mulheres sem a síndrome podem apresentar ovários policísticos devido outras causas, como outros distúrbios por excesso de andrógenos que não caracterizam a SOP (MOURA et al, 2011).

O direcionamento do tratamento da SOP vai depender da clínica e também dos resultados dos exames laboratoriais. O propósito do tratamento é reduzir os sinais clínicos do hiperandrogenismo e minimizar as manifestações metabólicas da SOP. A combinação da terapia medicamentosa (anticoncepcionais orais combinados, antiandrógenos e/ou agentes sensibilizadores de insulina), mudanças do estilo de vida, dieta balanceada e prática de atividade física se tornam essenciais para o tratamento da SOP e melhoria na qualidade de vida da mulher (YARAK et al, 2005; LIM et al, 2016). Todas as práticas adotadas no tratamento da SOP também tem como objetivo a manutenção do peso ideal ou perda de peso, pois o excesso do mesmo pode contribuir significativamente para desenvolvimento da síndrome (YARAK et al, 2005; LEGRO et al, 2012).

Estima-se que mundialmente, 5% a 20% das mulheres em idade reprodutiva são afetadas pela SOP, porém essa prevalência pode variar dependendo do critério de diagnóstico empregado, sensibilidade na avaliação dos fenótipos e também da população pesquisada (AZZIZ et al, 2015; DUMESIC et al, 2015; BARBER et al, 2016). Uma meta-análise realizada em 2016, utilizou 24 artigos sobre prevalência da síndrome em vários países do mundo e verificou que as proporções de prevalência da SOP de acordo com o critério empregado foi de 6% pelo NIH e 10% pelos Consensos de Rotterdam e AES-PCOS. Quando foi avaliada a prevalência pelos sinais e sintomas, as proporções foram: 13% para hirsutismo, 11% para hiperandrogenismo bioquímico, 28% para ovários policísticos e 15% para oligoanovulação, e concluiu-se que os critérios de Rotterdam e AES-PCOS tornam a prevalência de SOP similares e duas vezes mais elevadas que o Consenso do NIH, e quanto aos sinais clínicos, a oligoanovulação é menos frequente na Europa, o hirsutismo e hiperandrogenismo bioquímico possuem menores taxas na Ásia, e a taxa global dos ovários policísticos foi 28% (BOZDAG et al, 2016).

No Brasil, uma pesquisa realizada em Salvador, Bahia, mostrou que a prevalência de SOP na população estudada foi de 8,5% quando empregados os critérios de Rotterdam, e de 8,03% quando utilizados os critérios da NIH, não

evidenciando diferença na prevalência da síndrome entre os dois consensos. (GABRIELLI; AQUINO, 2012).

2.1.2 Comorbidades associadas à SOP

A SOP é uma desordem endocrinológica e tem sido associada a várias doenças. Mulheres com SOP podem apresentar risco aumentado para distúrbios metabólicos, incluindo síndrome metabólica (HUANG; COVIELLO, 2012; de LEO et al, 2016), obesidade (LIM et al, 2012; CHEN et al, 2013, ORIO et al, 2016), *diabetes mellitus* (DM) (CHEN et al, 2013; SIRMANS; PATE, 2014, ORIO et al, 2016), infertilidade, carcinoma de endométrio (BARTHELMESS; NAZ, 2014), complicações obstétricas (PALOMBA et al, 2015) e também doenças cardiovasculares, como arteriosclerose, doença vascular tromboembólica e hipertensão arterial sistólica (KAO et al, 2013; NANDI et al, 2014, ORIO et al, 2016).

A síndrome não é uma patologia que afeta somente a função reprodutiva, mas também pode aumentar o risco para o desenvolvimento da Síndrome Metabólica (SM). As mulheres com SOP podem apresentar vários parâmetros que caracterizam a SM, como obesidade e/ou obesidade central, risco para problemas cardiovasculares e DM (INSENER et al, 2013; OZEGOWSKA et al, 2016). Atualmente a SM é determinada pela presença de 3 dos 5 critérios: obesidade central; glicemia de jejum $\geq 100\text{mg/dL}$; pressão arterial $\geq 130\text{ mg/dL}$; triglicerídeos $\geq 150\text{ mg/dL}$ e HDL $< 50\text{mg/dL}$ (para mulheres) (FERREIRA et al, 2011).

O ganho de peso e a obesidade central são características comum da SOP, e geralmente precedem o início dos ciclos anovulatórios. A gordura visceral está associada a resistência insulínica (RI) resultando em anormalidades reprodutivas e endocrinológicas (ORIO et al, 2016). A RI e a disfunção das células beta do pâncreas são fatores de risco para DM 2 em SOP (MORAN et al, 2010; ÁVILA et al, 2014). O excesso de secreção de andrógenos também pode contribuir para RI em SOP (HUANG; COVIELLO, 2012).

Um dos parâmetros avaliados para a SM é a obesidade, e está presente em cerca de 50% das mulheres com SOP, sendo um fator de risco à saúde dessas mulheres. A obesidade pode estar associada com o desenvolvimento das manifestações clínicas, bioquímicas e de alterações de fatores metabólicos da SOP (CHEN et al, 2013). Muitas mulheres com SOP possuem maior massa de gordura

visceral e subcutânea, e a gordura visceral pode estar correlacionada com o nível de RI (HUANG; COVIELLO, 2012). Uma meta-análise mostrou que mulheres com a síndrome tem elevada prevalência de sobrepeso, obesidade central e obesidade, independente da idade, critério de diagnóstico ou região geográfica (LIM et al, 2012).

A obesidade por sua vez pode influenciar para que as mulheres com SOP tenha risco aumentado para desenvolver DM (CHEN et al, 2013; SIRMANS; PATE, 2014; ORIO et al, 2016). Estima-se que a cada ano, mais de 2% das mulheres com SOP tem risco de desenvolver diabetes. As pesquisas demonstram que mulheres com SOP, ainda jovens, possuem elevado risco de desenvolver DM2 (MORGAN et al, 2012).

A SOP também aumenta o risco para infertilidade determinado pela oligoanovulação ou a anovulação crônica (TRIKUDANATHAN, 2015). As mulheres com a síndrome tem o processo de oogenese diferente das mulheres com ciclo normal, essa condição está relacionada com as alterações nos hormônios envolvidos no processo de oogenese na SOP. As células da teca do ovário produzem andrógenos para as células da granulosa adjacentes para assim ocorrer a conversão em estradiol, todo esse mecanismo funciona em resposta à estimulação do Hormônio Luteinizante (LH) e insulina. Mulheres com SOP podem apresentar hiperinsulinemia, e o excesso de insulina nos ovários pode aumentar a resposta da granulosa pelo o LH, produzindo maiores quantidades de andrógenos. O excesso de LH também pode causar maturação precoce das células da granulosa (BARTHELMESS; NAZ, 2014). A obesidade, mudanças desfavoráveis do endométrio e a diminuição da capacidade do desenvolvimento do oócito também são mecanismos que contribuem na indução da infertilidade. (BARTHELMESS; NAZ, 2014; TRIKUDANATHAN, 2015).

O endométrio exposto de forma crônica ao estrógeno sem oposição pode resultar em hiperplasia do endométrio devido à anovulação em SOP, fator que pode aumentar risco de câncer endometrial (TRIKUDANATHAN, 2015). A progesterona é um hormônio que pode proteger o endométrio quando estimulado por crescimento e proliferação por estrogênio, e mulheres com SOP tem prologada exposição do endométrio ao estrogênio sem oposição por consequência da anovulação e possuir insuficiência ou resistência à progesterona, aumentando o risco para o surgimento de câncer endometrial (DUMESIC; LOBO, 2013). A obesidade, RI e DM2 associadas à SOP, são fatores de risco para carcinoma endometrial (LI; SHAO, 2014). Alguns

trabalhos evidenciam que as mulheres com SOP tem risco elevado para desenvolver câncer endometrial (BARRY et al, 2014; GOTTSCHAU et al, 2015).

A incidência de complicações obstétricas em mulheres com SOP pode ser resultante de uma série de fatores característicos da síndrome, tais como, tratamento para infertilidade, múltiplas gravidezes, obesidade, RI e disfunções metabólicas. Uma meta-análise mostra um aumento do risco de hipertensão induzido pela gravidez ou pré-eclâmpsia em mulheres com SOP (PALOMBA et al, 2015).

As doenças cardiovasculares, como aterosclerose, doença vascular tromboembólica e HAS, podem apresentar-se com risco aumentado por consequências da SOP (KAO et al, 2013; NANDI et al, 2014, ORIO et al, 2016). A ocorrência de obesidade, RI, dislipidemia, HAS e o hiperandrogenismo são fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em SOP (ORIO et al, 2016). Uma pesquisa realizada em 2016, com 239 mulheres com a síndrome, não diabéticas, pré-diabéticas e com diabetes, evidenciou que mulheres com SOP em associação com incidência de pré-diabetes tem risco aumentado para desenvolver doenças cardiovasculares (ASIMI et al, 2016). Um outro estudo incluindo 2.301 pacientes com SOP, determinou a presença de doenças cardiovasculares e DM2 na síndrome e demonstrou que fatores como histórico de hipertensão, idade avançada, ganho de peso, tabagismo e diabetes naquela população elevou o risco de eventos cardiovasculares (MANI et al, 2013). Um estudo realizado no Brasil, mostrou uma correlação com dados antropométricos, pressão arterial sistólica e o perfil lipídico de pacientes com SOP com elevado fator de risco cardiovascular (SOUSA et al, 2013). Esses trabalhos reforçam a necessidade de atenção a fatores relacionados com a síndrome e aumento de risco para desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares (MANI et al, 2013).

2.1.3 SOP: uma doença multifatorial

A etiologia da SOP não está totalmente elucidada, porém vários trabalhos demonstram que a síndrome é uma doença multifatorial, com combinação de fatores ambientais e fatores genéticos que podem ser determinantes no desenvolvimento da síndrome (DIAMANTI-KANDARAKIS et al, 2006; DUMESIC et al, 2015; MERKIN et al, 2016; JONES; GOOZARDI, 2016).

Os fatores ambientais podem ser elementos atuantes na etiologia, prevalência e/ou nas modulações dos fenótipos da SOP. As toxinas ambientais, como substâncias do cigarro e pesticidas, e elementos como chumbo e mercúrio promovem diversos efeitos nos organismos biológicos, e podem afetar a saúde reprodutiva. Embora essas toxinas sejam prejudiciais para a população em geral, os disruptores endócrinos químicos que interferem no sistema endócrino (EDCs- do inglês *endocrine-disrupting chemicals*) são considerados alvo de estudo para a saúde reprodutiva, incluindo a SOP e suas manifestações clínicas (MERKIN et al, 2016). Algumas pesquisas demonstraram que mulheres com SOP quando comparadas à controles, tinham os níveis séricos significativamente mais elevados de compostos perfluorados, PCBs - bifenilos policlorados (do inglês *Polychlorinated biphenyls*), pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (VAGI et al, 2014; YANG et al, 2015).

A alimentação tem papel fundamental na SOP, pois a ingestão correta das quantidades de carboidratos, proteínas e gorduras e o aumento do consumo de fibras, cereais, frutas e vegetais diminui significativamente as manifestações clínicas da SOP e ainda reduz o risco de doenças associadas à síndrome. Porém a dieta alimentar inadequada, pode influenciar no ganho de peso e falta de nutrientes essenciais, assim esses fatores podem ser contribuintes na etiologia da síndrome (NORMAN et al, 2002; MERKIN et al, 2016).

A prática de atividade física é essencial para as mulheres em geral, mas para as que tem SOP apresenta ainda mais vantagens, pois contribui na intervenção dos sinais clínicos e comorbidades associadas à síndrome, como a RI, infertilidade, obesidade, doenças cardiovasculares, além de levar ao bem estar físico e mental dessas mulheres (NORMAN et al, 2002; MERKIN et al, 2016). A combinação da dieta equilibrada e prática de exercícios físicos são relevantes para perda de peso e manutenção do peso no tratamento das mulheres com SOP.

Os hábitos tabagista e etilista são fatores para o aumento de risco para a redução da fertilidade, complicações na gravidez, abortos espontâneos, doenças cardiovasculares e RI na SOP (NORMAN et al, 2002). Portanto, torna-se importante mudanças no estilo de vida, para que as mulheres reduzem o risco de desenvolver SOP, e para as mulheres que já foram diagnosticadas com a síndrome, essas mudanças seriam benéficas para o tratamento da doença.

Em relação aos fatores genéticos, os estudos demonstram que genes que codificam proteínas envolvidas nas vias metabólicas, na biossíntese e atividade de

andrógenos, do sistema imunológico, entre outros (KOSOVA; URBANEK, 2013; VEKATESH et al, 2014; SHIM et al, 2015; JONES; GOOZARDI, 2016; ZHAO et al, 2016) estão associados à etiologia da síndrome. O Quadro 2 representa alguns genes candidatos associados com SOP.

Quadro 2 - Genes candidatos associados aos estudos em SOP.

CATEGORIAS	FUNÇÃO	GENES
Biossíntese e atividade de andrógenos	Esteroidogênese	<i>CYP17A1, CYP19, CYP21, HSD17B5, HSD17B6</i>
	Hormônios Sexuais e seus Receptores	<i>AR, SHBG, FSH, FSHR, LHCGR</i>
Metabolismo	Secreção e Regulação da insulina / Resistência insulínica	<i>INS, INSR, IRS1, IRS2, IGF, PPAR-γ, CAPN10, STXBP1, PLCB2, PLCB3, GNAQ</i>
	Obesidade, Diabetes tipo 2 e Doenças Cardiovasculares	<i>FTO, TCF7L2, MTHFR</i>
Sistema Imunológico	Citocinas inflamatórios e Autoimunidade	<i>TNF-α, IL-6, IL-1A, IL-1B, PAI HLA-A, VDR</i>
Outras	Desenvolvimento Folicular	<i>FBN3, BMP15, GDF9, TGF-β</i>
	Desenvolvimento de Oócitos	<i>SMC3, CCNE2, PPP2R5D, PPP2R5C, PLCZ1, PPP2R5A, PPP1CB</i>

Fonte: Shim et al, 2015; Zhao et al, 2016.

2.1.4 Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico ou folato é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel e é adquirida pela dieta alimentar. Essa vitamina é encontrada em maior concentração em leveduras, vegetais folhosos verdes escuros frescos, fígado e outras vísceras, amendoim, ovo, cereais enriquecidos e grãos integrais (VANUCCHI; MONTEIRO, 2010).

O folato tem papel importante em vários processos fisiológicos, como síntese de purinas e pirimidinas, síntese de aminoácidos e processo de metilação (KANDI; VADAKEDATH, 2015; DESAI et al, 2016). Mecanismos epigenéticos, como o processo de metilação do DNA, são mudanças que não alteram a sequência do mesmo, mas pode alterar a expressão gênica. O DNA metilado geralmente silencia a transcrição de um gene por não ser reconhecido por enzimas que participam do processo de transcrição (KANDI; VADAKEDATH, 2015). Modificações epigenéticas do DNA são relevantes na funcionalidade do organismo, pois regulam a expressão

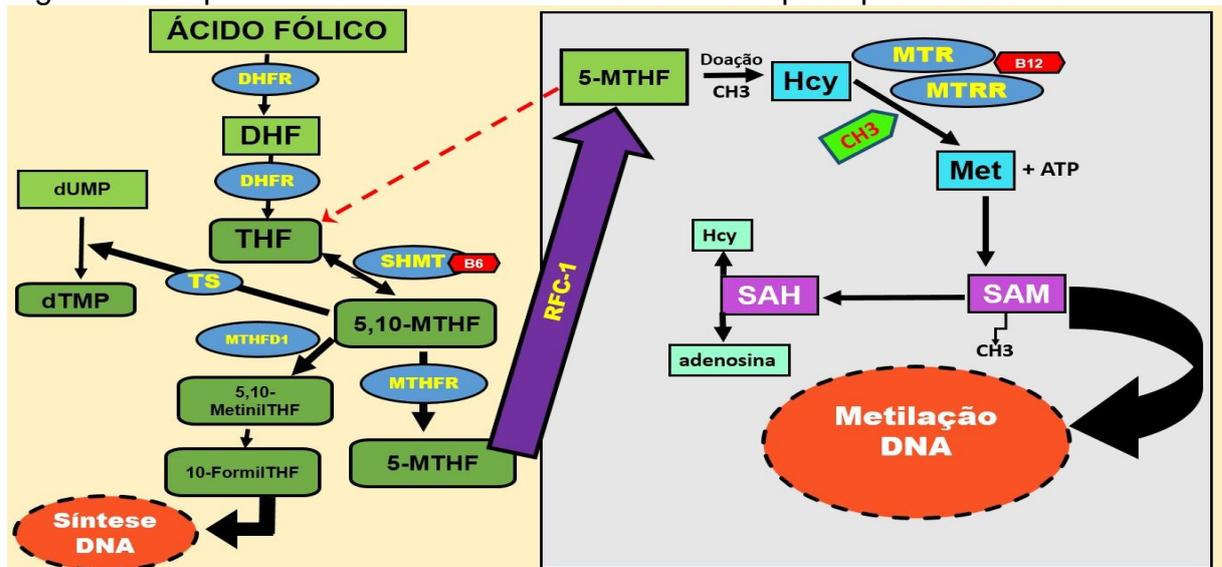
gênica, estabilizam a estrutura da cromatina e mantém a estabilidade genômica (GALBIATTI et al, 2012).

O ácido fólico ingerido é a forma inativa de folato e não é absorvido pelo organismo, e deve ser convertido para se torna a forma biologicamente ativa. A absorção do folato é iniciada nas células do intestino, nas regiões de duodeno e jejuno (VANUCCHI; MONTEIRO, 2010).

O ácido fólico é reduzido a Dihidrofolato e em seguida convertido a Tetrahydrofolato (THF) pela enzima Dihidrofolato Redutase (DHFR) (FOWLER, 2001). A enzima Serina Hidroximetiltransferase (SHMT) realiza a reação reversível de THF em 5,10-Metilenotetrahydrofolato (5,10-MTHF) (FOX; STOVER, 2008), que é convertido em 5,10-MTHF em 5-Metiltetrahydrofolato (5-MTHF), forma circulante e doadora de grupo metil (CH₃) na remetilação de Hcy para metionina pela enzima Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR) (GOYETTE et al, 1994). Na reação de remetilação de Hcy para metionina, há a atuação da enzima Metionina Sintase (MTR) juntamente com Vitamina B12 (cofator da reação). A metionina formada juntamente com o trifosfato de adenosina (ATP) formam S-adenosilmetionina (SAM) (FOX; STOVER, 2008). A enzima Metionina Sintase Redutase (MTRR) mantém a ativação da enzima MTR (YAMADA et al, 2006). Na reação de desmetilação de Hcy há formação de S-adenosilhomocisteína (SAH), liberando adenosina e Hcy e essa reação pode ser um determinante nas concentrações de Hcy (SINGH; LELE, 2012).

Com a regeneração da metionina e recuperação da homocisteína, após a doação do grupo CH₃, o THF pode ser utilizado para a síntese de Timidilato Sintase (TS). O 5,10-MTHF é usado como substrato dessa reação e converte deoxiuridina monofosfato (dUMP) à timidina monofosfato (dTMP) (BLOM; SMULDERS, 2011). A Metilenotetrahydrofolato Desidrogenase 1 (MTHFD1) converte 5,10-MTHF a 5,10-metnil-THF e em seguida para 10-formil-THF, são substratos para a síntese de metionina, timidilato e purinas (STEVENS et al, 2007). A enzima Carreadora de Folato Reduzido 1 (RFC-1) atua na absorção e transporte de 5-MTHF para interior de vários tipos celulares (NGUYEN et al, 1997). A Figura 1 mostra um esquema do metabolismo do folato destacando as principais enzimas envolvidas nessa via metabólica. O Quadro 3 apresenta a descrição de cada uma das principais enzimas que participam do metabolismo do folato.

Figura 1 - Esquema do Metabolismo do Folato e suas principais enzimas.



5-MTHF: 5-Metiltetrahidrofolato; 5,10-MTHF: 5,10-Metilenotetrahidrofolato; ATP: Trifosfato de adenosina; B6: Vitamina B6; B12: Vitamina B12; CH3: Metil; DHF: Dihidrofolato; DHFR: Dihidrofolato redutase; DNA: Ácido Desoxirribonucleico; dTMP: Timidina monofosfato; dUMP: Deoxiuridina monofosfato; Hcy: Homocisteína; Met: Metionina; MTHFD 1: Metilenotetrahidrofolato Desidrogenase 1; MTHFR: Metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: Metionina sintase; MTRR: Metionina sintase redutase; RFC-1: Carreador de folato reduzido 1; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; SHMT: Serina hidroximetiltransferase; TS: Timidilato sintase; THF: Tetrahidrofolato.

Fonte: Adaptado GALBIATTI *et al.*, 2012.

Quadro 3- Principais enzimas participantes no metabolismo do folato.

ENZIMA	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
DHFR	A Dihidrofolato Redutase catalisa a redução do ácido fólico na dieta ou dihidrofolato em THF. Os compostos de folato são assim reduzidos de modo a sintetizar as coenzimas. O THF é essencial para a síntese de purina e timidilato, portanto, a DHFR tem um papel crítico no crescimento e proliferação celular.	FOWLER, 2001.
TS	A Timidilato Sintase catalisa a conversão de dUMP em dTMP utilizando 5,10-MTHF, doador de grupo metil. O dTMP tem papel importante na replicação e reparo do DNA.	BLOM e SMULDERS, 2011.
SHMT	Ao catalisar a clivagem de serina, a Serina Hidroximetiltransferase transfere um grupo CH ₃ da serina para THF gerando glicina e 5,10-MTHF, o cofactor requerido para a biossíntese timidilato.	FOX e STOVER, 2008.
MTHFD1	A Metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 catalisa a oxidação do 5,10-MTHF a 5,10-MTHF, que em seguida é convertido para 10-formil-THF, que doa o seu grupo formil em duas etapas diferentes na biossíntese de purina.	STEVENS <i>et al.</i> 2007.
MTHFR	A Metilenotetrahidrofolato redutase realiza uma reação central no metabolismo do folato, pois converte 5,10-MTHF em 5-MTHF, forma circulante e doadora de grupo CH ₃ na remetilação de Hcy para metionina.	GOYETTE <i>et al.</i> 1994.
MTR	A Metionina Sintase é uma enzima dependente de vitamina B12 que funciona dentro do ciclo de catalisação da remetilação dependente de 5-MTHF de Hcy a metionina. A reação é vital, uma vez que assegura a Metionina para a produção de SAM, doador de grupo CH ₃ . Essa enzima participa em importantes funções fisiológicas: a regeneração do de THF, a síntese de metionina e a remoção de Hcy celular.	FOX e STOVER, 2008.

ENZIMA	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
MTRR	A Metionina Sintase Redutase é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima MTR. Essa enzima reativa o complexo MTR + Vitamina B12 (II) por redução de metilação, utilizando SAM como um doador de grupo CH ₃ .	YAMADA <i>et al.</i> 2006.
RFC-1	A enzima Carreadora de Folato Reduzido 1, também encontrada nas membranas celulares da mucosa do intestino, atua na absorção e transporte de 5-MTHF para interior de vários tipos celulares. Pode ser fator determinante da disponibilidade da concentração de folato intracelular.	NGUYEN <i>et al.</i> 1997.

Fonte: Autora, 2017.

Modificações epigenéticas, como alterações na metilação do DNA, podem estar envolvidas da etiologia da SOP. Alguns trabalhos apresentaram evidências que mudanças na metilação do DNA podem influenciar na regulação de genes candidatos aos estudos relacionados com a etiologia ou prevalência dos fenótipos da SOP (ILLIE; GEORGESCOU, 2015; YU et al, 2015; PRUKSANANONDA et al, 2016). Outros trabalhos demonstraram que o excesso de andrógenos ainda na fase fetal, influenciam em mudanças epigenéticas e contribui para o desenvolvimento de SOP (LI; HUANG, 2008; XU et al, 2011). Além disso, mudanças na metilação do DNA estão associadas à doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e câncer (KANDI; VADAKEDATH, 2015), nas quais podem ser comorbidades da SOP, conforme já descrito.

Além de modificações epigenéticas do DNA, as alterações nas atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem causar hiperhomocisteinemia em mulheres com SOP (PALEP-SINGH et al, 2008), que pode ter como consequências: dificuldade para engravidar (BERKER et al, 2009; IDALI et al, 2012) e também o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como hiperlipidemia, dislipidemias, hiperinsulinemia, resistência insulínica e DM. Há vários trabalhos apresentaram que a hiperhomocisteinemia pode ser fator contribuinte em diversas doenças cardiovasculares e podem estar associadas com SOP (BADAWY et al, 2007; GUZELMERIC et al, 2007; SALEHPOUR et al, 2011; SEN et al, 2011).

2.1.5 Polimorfismos genéticos das enzimas do metabolismo do folato e SOP

Os polimorfismos genéticos são modificações que ocorrem na sequência do DNA, com frequência maior que 1% na população e também são responsáveis pela diversidade humana, pois os fenótipos podem ser decorrentes de diferentes polimorfismos (ROCHA et al, 2007). Essas variações no DNA podem ocorrer por

substituição, inserção ou deleção de nucleotídeos, dentre as variações, nos Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) há a troca de um nucleotídeo na sequência do DNA, que pode contribuir na suscetibilidade de doenças (WU et al, 2016).

Mudanças nos níveis de folato no organismo podem estar associadas com deficiências nutricionais ou deficiência nas atividades das enzimas (VANUCCHI; MONTEIRO, 2011). Os processos biológicos, como a biossíntese de purinas e pirimidinas, necessitam de níveis adequados de folato no organismo. E alterações nos níveis do folato devido a polimorfismos genéticos envolvidos em sua via metabólica estão associadas com mudanças de metilação, na síntese e reparo do DNA, assim comprometendo os mecanismos biológicos dependente de folato (GALBIATTI et al, 2012).

Polimorfismos genéticos que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem estar envolvidos em alterações da atividade enzimática e assim podem influenciar no desenvolvimento de distúrbios metabólicos no organismo, principalmente pela ocorrência de hiperhomocisteinemia e mudanças de metilação do DNA (GALBIATTI et al, 2012; ROZYCKA et al, 2013; NASKI et al, 2014; PETRAS et al, 2014). Algumas pesquisas mostraram que mulheres com SOP podem apresentar elevação do nível sérico de Hcy (BADAWY et al, 2007; SALEHPOUR et al, 2011; SEN et al, 2011). Há evidências de que as alterações nos padrões de metilação também podem estar implicados na etiologia e/ou nas manifestações clínicas e bioquímicas da síndrome (ILLIE; GEORGESCOU, 2015; YU et al, 2015; PRUKSANANONDA et al, 2016).

A enzima MTHFR é codificada pelo gene *MTHFR* que está localizado no cromossomo 1 (1p36.3) (GOYETTE et al, 1994), destacado pela seta em vermelho na Figura 2. Um estudo relacionado com o polimorfismo C677T no gene *MTHFR* (rs 1801133) demonstrou que a variante genética T pode sintetizar uma enzima com menor termolabilidade e potencial catalítico reduzido. No SNP *MTHFR* C677T há a troca de bases de C para T na posição do nucleotídeo 677, ocorrendo a substituição dos aminoácidos de alanina por valina. Essa alteração pode estar associada com elevação de Hcy plasmática e diminuição do folato no plasma (FROSST et al, 1995). No polimorfismo *MTHFR* A1298C (rs 1801131), há a troca de bases de A para C na posição do nucleotídeo 1298, e a substituição dos aminoácidos glutamina para alanina (VAN DER PUT et al, 1998). Esse SNP foi associado, *in vitro*, com diminuição da

atividade enzimática, mas em menor proporção em relação ao polimorfismo *MTHFR* C677T (WEISBERG et al, 1998). Um estudo apresentou que a variante 1298C no gene *MTHFR* estava relacionada com mudanças nos níveis de Hcy plasmática (CASTRO et al, 2003).

Figura 2 – Desenho esquemático do cromossomo 1. A seta vermelha indica a posição cromossômica do gene *Metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR)* nesse cromossomo - 1p36.3.



Fonte: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000177000;r=1:11785723-11806920.

Na literatura há vários trabalhos que investigaram a associação de SOP e os polimorfismos do gene *MTHFR*. Entretanto, esses estudos apresentaram resultados contraditórios, o Quadro 4 sumariza alguns trabalhos com os polimorfismos do gene *MTHFR* e a síndrome. Alguns pesquisadores realizaram meta-análises para avaliar a relação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e a síndrome (BAGOS, 2009; FU et al 2014; LEE; SONG, 2014; CARLUS et al, 2016). A meta-análise de Fu e colaboradores (2014), demonstrou que o alelo T do polimorfismo *MTHFR* C677T está associado ao aumento da suscetibilidade a SOP em mulheres europeias.

Quadro 4 - Estudos de Caso-Controle com os polimorfismos do gene *MTHFR* e SOP.

Autor	País	Polimorfismo	Número		Conclusão do Estudo
			Casos	Controles	
Wu et al. 2016	China	<i>MTHFR</i> C677T <i>MTHFR</i> A1298C	244	257	Não houve associação entre os polimorfismos estudados e SOP.
Szafarowska et al. 2016.	Polônia	<i>MTHFR</i> C677T <i>MTHFR</i> A1298C	76	56	Não houve associação entre o polimorfismo estudado e SOP.
Carlus et al. 2016.	Índia	<i>MTHFR</i> C677T	261	256	Não houve associação entre o polimorfismo estudado e SOP.
Qi et al. 2015.	China	<i>MTHFR</i> C677T <i>MTHFR</i> A1298C	115	58	Houve associação entre o polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T e SOP, mas não houve associação com o polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C e a síndrome.

Continua

Autor	País	Polimorfismo	Número		Conclusão do Estudo
			Casos	Controles	
Idali et al. 2012	Irã	<i>MTHFR</i> C677T <i>MTHFR</i> A1298C	71	106	Não houve associação entre SOP e os polimorfismos <i>MTHFR</i> A1298C e C677T. Houve associação dos polimorfismos em mulheres com SOP e aborto recorrente.
Jain et al. 2012.	Índia	<i>MTHFR</i> C677T	92	95	Não houve associação entre SOP e o polimorfismo estudado. Mas ocorreu associação entre a suscetibilidade para a hiperlipidemia em mulheres com SOP.
Karadeniz et al. 2010.	Turquia	<i>MTHFR</i> C677T	86	70	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.
Choi et al. 2009.	Coréia	<i>MTHFR</i> C677T	227	115	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.
Orio et al. 2003.	Itália	<i>MTHFR</i> C677T	70	70	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.
Tsanadis et al. 2002.	Grécia	<i>MTHFR</i> C677T	30	45	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.
Sills et al. 2001.	EUA	<i>MTHFR</i> C677T	36	18	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.
Glueck et al. 1999.	EUA	<i>MTHFR</i> C677T	149	234	Não houve associação com o polimorfismo estudado e SOP.

MTHFR: Metilenotetrahidrofolato Redutase; SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos. EUA: Estados Unidos da América.

Fonte: Autora, 2017.

A enzima MTR é codificada pelo gene *MTR* e está localizada no cromossomo 1 (1q43) (LI et al, 1996), a Figura 3 apresenta a localização cromossômica, destacada pela seta em vermelho. A troca de bases de A para G na posição do nucleotídeo 2756 no polimorfismo do gene *MTR* A2756G (rs 1805087), resulta na troca do aminoácido ácido aspártico por glicina (LECLERC et al, 1996), e pode ocorrer alterações na estrutura tridimensional da proteína e possivelmente causar oxidação inadequada do cofator, podendo acarretar para redução da atividade enzimática associado com o aumento de Hcy celular, e causar hiperhomocisteinemia (ROZYCKA et al, 2013). Um estudo indicou que a baixa atividade catalítica da MTR resulta na hipometilação de

DNA, que pode ser devido baixos níveis de produção de SAM, e estava relacionada com linfoma maligno (MATSUO et al 2001). Até o momento, há um trabalho de associação entre a síndrome e o SNP *MTR* A2756G. Palep-Singh e colaboradores (2008) concluíram que genótipo AA (tipo selvagem) estava relacionado com SOP e níveis elevados de Hcy.

Figura 3 - Desenho esquemático do cromossomo 1. A seta vermelha indica a posição cromossômica do gene *Metionina sintase (MTR)* nesse cromossomo - (1q43).



Fonte: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000116984;r=1:236795281-236903981.

Localizado no cromossomo 5 (5p15.3), representado na Figura 4 está o gene *MTRR* que codifica a enzima MTRR (LECLERC et al, 1998), que está em destaque pela seta em vermelho. A troca dos aminoácidos isoleucina por metionina é o resultado do polimorfismo do gene *MTRR* A66G (rs 1801394), onde há a troca de bases de A para G na posição do nucleotídeo 66 (WILSON et al, 1999), e um estudo demonstrou que essa variante foi associado com mudanças nos níveis totais de Hcy (GAUGHAN et al, 2001). Ainda não há estudos que associam SOP e SNP *MTRR* A66G. Mas existem estudos que avaliaram a associação do polimorfismo *MTRR*A66G e alterações nos perfis lipídicos, principalmente colesterol total e triglicerídeos (LI et al, 2015), aumento no risco de doença da artéria coronária (LAKSHMI et al, 2011) e excesso de peso (FAN et al, 2015), e essas manifestações clínicas podem ser consequência da SOP (ECONOMOU, 2011; LIM et al, 2012; CHEN et al, 2013; KAO et al, 2013; NANDI et al, 2014).

Figura 4 - Desenho esquemático do cromossomo 5. A seta vermelha indica a posição cromossômica do gene *Metionina sintase redutase (MTRR)* nesse cromossomo - 5p15.3.



Fonte: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000124275;r=5:7851186-7906025.

O gene *RFC-1* codifica a enzima RFC-1, e está localizado no cromossomo 21 (21q22.3) (YANG-FENG et al, 1995) representado na Figura 5 e destacado pela seta em vermelho. A troca das bases de A para G na posição do nucleotídeo 80 no polimorfismo do gene *RFC-1* A80G (rs 1051266), resulta na substituição do aminoácido histidina por arginina (CHANGO et al, 2000). O efeito biológico SNP ainda não está bem estabelecido, mas alguns estudos demonstraram que podem estar associados com alterações nos níveis de Hcy e folato plasmático (NIEDZIELSKA et al, 2013; KIM et al, 2015; HUANG et al, 2016). Além disso, essas alterações podem influenciar na metilação do DNA (FARKAS et al, 2015; MORUZZI et al, 2016). Até o momento não há estudos relacionando SOP e o polimorfismo *RFC-1* A80G, mas há alguns estudos que investigaram a associação entre a hiperhomocisteinemia, essa variante genética e complicações na gravidez, como descolamento de placenta e aborto espontâneo (ANANTH et al, 2008; LI LUO et al, 2015), e as mulheres com SOP podem apresentar complicações obstétricas (PALOMBA et al, 2015). Assim como outras manifestações clínicas decorrente de hiperhomocisteinemia, que podem contribuir para doenças associadas a SOP.

Figura 5 - Desenho esquemático do cromossomo 21. A seta vermelha indica a posição cromossômica do gene *Carreador de Folato Reduzido 1 (RFC-1)* nesse cromossomo - 21q22.3.



Fonte: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000173638;r=21:45493572-45544411.

2.1.6 Polimorfismos genéticos e Biomarcadores

Estudos de polimorfismos genéticos são relevantes, pois podem ser bons biomarcadores, ou seja, são indicadores biológicos que podem auxiliar na compreensão de processos biológicos, processos patológicos e/ou respostas terapêuticas. Os compostos estruturais, celulares e bioquímicos, como ácidos nucleicos, proteínas, açúcares, lipídeos e metabólicos podem ser considerados biomarcadores, pois permitem avaliar alterações aos níveis celulares e/ou moleculares. Portanto, a análise de SNPs pode ser uma interessante ferramenta da genética, contribuindo para entendimento de alterações estruturais e funcionais no

organismo, bem como para a compreensão das modificações podem influenciar na etiologia ou patogênese de doenças (SAAD et al, 2016; RATHER, DHAWAN, 2016). As informações fornecidas por essas análises genéticas podem auxiliar para desenvolvimento de meios de diagnóstico e prognóstico individualizado aos pacientes (ARANTES et al, 2014; DIX et al, 2016).

Em SOP, os biomarcadores que auxiliam no diagnóstico são principalmente os hormônios relacionadas ao surgimento de aspecto hiperandrogênico, como testosterona, SDHEA e androstenediona; os níveis de hormônios sexuais, como SHBG, AMH (Hormônio Antimulleriano), LH, FSH e estrógenos; e também as biomoléculas envolvidas aos fatores de risco para DM, obesidade, RI e doenças cardiovasculares.

Os mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, também podem ter implicações na SOP, e assim auxiliar na elucidação da etiologia ou nos fenótipos da síndrome. Portanto, as pesquisas realizadas nesse campo da genética podem ser muito úteis, pois a metilação do DNA pode ser um atrativo biomarcador na detecção da síndrome, e assim contribuir no diagnóstico e tratamento da doença (XU et al, 2010; ILLIE; GEORGESCOU, 2015; YU et al, 2015).

2.2 JUSTIFICATIVA

A SOP é uma patologia endocrinológica de grande relevância e comum em mulheres na idade reprodutiva e com a etiologia ainda não totalmente esclarecida. Alterações da atividade enzimática no metabolismo do folato podem acarretar para alterações importantes, como a metilação do DNA e elevação dos níveis de homocisteína, e esses fatores podem estar envolvidos na etiologia e com os distúrbios metabólicos da SOP. E essas alterações podem estar relacionadas com polimorfismos genéticos das enzimas do metabolismo do folato, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *RFC-1*.

Há trabalhos na literatura que demonstram a associação entre os SNPs de algumas dessas enzimas da via do folato e SOP. No Brasil há poucos estudos visando os conhecimentos sobre a síndrome, e até o momento não há trabalhos brasileiros que relacionam genes das enzimas do metabolismo do folato e SOP.

Assim, considerando as manifestações clínicas e as comorbidades em SOP, e os estudos já realizados com os genes das enzimas do metabolismo do folato e várias

doenças ou complicações associadas à síndrome, realizar uma avaliação genética envolvendo esses genes podem contribuir para o entendimento da doença.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral:

- Com base nas evidências apresentadas, este estudo tem como objetivo geral identificar as variantes genéticas do metabolismo do folato, relacionadas com o desenvolvimento da Síndrome dos Ovários Policísticos.

2.3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a frequência e avaliar a associação de polimorfismos dos genes *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *RFC-1* A80G em mulheres com SOP e em uma população controle.
- Comparar a frequência dos haplótipos dos polimorfismos no gene *MTHFR*;
- Analisar a associação destes polimorfismos com os fatores de risco para a doença.

2.4 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

2.4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) sob número de protocolo 1796 (Anexo A). Todas as mulheres que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B).

2.4.2 Casuística

A casuística do estudo teve a participação de 203 mulheres, que foram avaliadas pelos médicos membros da equipe de pesquisa, nos Setores de Ginecologia e Obstetrícia, e Endocrinologia de Gônadas e Adrenal do Ambulatório de Maria da Glória do HC–UFTM (Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro). A inclusão das participantes no estudo ocorreu no período entre 2012 a 2016.

Neste estudo, o grupo caso foi composto por 99 mulheres com SOP que apresentaram seguintes critérios: estar em idade reprodutiva e ser diagnosticada com Síndrome dos Ovários Policísticos, de acordo com os critérios de Rotterdam.

O grupo controle foi constituído por 104 mulheres que se apresentaram em idade reprodutiva, sem uso de atual ou superior a 3 meses de anticoncepcionais e sem histórico ou sinais de SOP.

2.4.3 Critérios de Exclusão

Como critério de exclusão para estudo, as mulheres não poderiam apresentar Síndrome de Cushing, deficiência de 21-hidroxilase, disfunção da tireóide, hiperprolactinemia, diabetes, tumores secretores de andrógenos, e uso atual de anti-andrógenos, estatinas, glucocorticóides ou medicações para infertilidade.

2.4.4 Coleta de Dados

Para coleta de dados sociodemográficos foi realizado um questionário com as mulheres para levantamento de idade, hábitos de tabagismo e etilismo e histórico SOP familiar. Foi realizado também o levantamento de dados clínicos quanto paridade (nº de gestações, nº de partos, nº de aborto), padrão menstrual (intervalo, duração, volume), fatores associados à infertilidade, comorbidades, uso de medicação de hormonal ou não hormonal, aspectos hiperandrogênicos (hirsutismo, acne, oleosidade de pele ou cabelo e queda de cabelo), peso, altura, IMC (índice de massa corporal). Os dados clínicos foram levantados pelo acompanhamento nas consultas médicas. A Tabela 1 apresenta a caracterização do grupo de estudo. O questionário para os dados coletados, descritos acima, está apresentado no Apêndice C.

Tabela 1 – Caracterização do grupo de estudo composto por mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP). Uberaba, MG - 2017.

Variáveis	SOP	CSOP
	N / n (% ou média)	N / n (% ou média)
Idade (anos)	97 (26,06*)	99 (31,73*)
Ausência de Gestação	96 / 76 (79,17)	99 / 38 (38,38)
Irregularidade Menstrual	97 / 34 (35,05)	98 / 06 (06,12)
Associação Fatores Infertilidade	95 / 11 (11,58)	100 / 03 (03,00)
Histórico SOP Familiar	95 / 37 (38,95)	100 / 20 (20,00)
Tabagismo	95 / 07 (07,37)	100 / 25 (25,00)
Etilismo	97 / 25 (25,77)	100 / 29 (29,00)
Comorbidades	94 / 44 (46,81)	98 / 29 (29,59)
Uso Medicação Hormonal	95 / 54 (56,84)	100 / 09 (09,00)
Hirsutismo	93 / 52 (55,91)	100 / 05 (05,00)
Acne	93 / 61 (65,59)	100 / 29 (29,00)
Oleosidade	93 / 73 (78,49)	100 / 49 (49,00)
Queda de Cabelo	92 / 58 (63,04)	99 / 35 (35,35)
Altura (m)	89 (1,63*)	96 (1,62*)
Peso (Kg)	91 (79,70*)	96 (67,34*)
IMC (Kg/m²)	89 (29,72*)	96 (25,44*)
Sobrepeso ou obesidade	89 / 58 (65,17)	96 / 48 (50,00)

*Média da variável; N: total de mulheres com a variável analisada; n: número de mulheres com a presença da variável analisada.

Fonte: Autora, 2017.

Os dados referentes aos exames laboratoriais foram coletados através de levantamento dos prontuários médicos. Foram coletados os seguintes exames laboratoriais: LH (Hormônio Folículo Estimulante), FSH (Hormônio Luteinizante), Função LH/FSH invertido; Prolactina; Progesterona; TSH (Hormônio Tiroestimulante)

e T4 Livre, Testosterona, 17 Alfa Hidroxiprogesterona, S-DHEA (Sulfato de Dehidroepiandrosterona), Cortisol e Insulina (Basal e Pós Prandial), Colesterol Total e Frações (HDL, LDL, VLDL e não-HDL) e Triglicerídeos, Glicose (Glicemia de Jejum, Pós Ingestão e Pós Prandial), TGO (Transaminase Glutâmica Oxalacética), TGP (Transaminase Glutâmica Pirúvica), PCR (Proteína C-Reativa); Creatinina, Ureia, Ácido Úrico, Ferritina, Vitamina B12, Ácido Fólico e Alguns íons, como Na (Sódio), K (Potássio), Ca (Cálcio), Mg (Magnésio) e P (Fósforo).

A Tabela 2 mostra a quantificação dos exames laboratoriais do grupo de estudo. Os valores de referência de cada exame estão apresentados no Anexo B.

Tabela 2 – Quantificação dos exames laboratoriais do grupo de estudo, composto por mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP), com alterações a partir dos valores de referência. Uberaba, MG - 2017.

DADOS LABORATORIAIS (unidade)	SOP		CSOP	
	N / n	(%)	N / n	(%)
FSH (mUI/mL)	67 / 4	(5,97)	37 / 1	(2,70)
LH (mUI/mL)	64 / 2	(3,13)	33 / 0	(0,00)
FUNÇÃO LH/FSH INVERTIDA	67 / 9	(13,43)	37 / 1	(2,70)
TSH (mUI/mL)	79 / 6	(7,59)	60 / 4	(6,67)
T4 LIVRE (ng/dL)	68 / 4	(5,88)	51 / 4	(7,84)
TESTOSTERONA TOTAL (ng/dL)	56 / 20	(35,71)	33 / 6	(18,18)
17 α-HIDROXIPROGESTERONA (ng/dL)	33 / 4	(12,12)	14 / 0	(0,00)
S-DHEA (mg/mL)	57 / 2	(3,51)	31 / 2	(6,45)
CORTISOL (µg/dL)	27 / 13	(48,15)	18 / 3	(16,67)
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	75 / 23	(30,67)	57 / 16	(28,07)
HDL (mg/dL)	72 / 14	(19,44)	54 / 9	(16,67)
LDL (mg/dL)	72 / 2	(2,78)	54 / 3	(5,56)
VLDL (mg/dL)	46 / 7	(15,22)	24 / 0	(0,00)
Não-HDL (mg/dL)	29 / 3	(10,34)	27 / 4	(14,81)
TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)	75 / 26	(34,67)	55 / 11	(20,00)
GLICOSE (mg/dL)	75 / 15	(20,00)	71 / 14	(19,72)
GLICEMIA PÓS-INGESTÃO (mg/dL)	9 / 2	(22,22)	8 / 0	(0,00)
GLICEMIA PÓS-PRANDIAL (mg/dL)	23 / 7	(30,43)	6 / 0	(0,00)
INSULINA BASAL (mcUI/mL)	40 / 14	(35,00)	25 / 2	(8,00)
INSULINA PÓS-PRANDIAL (mcUI/mL)	16 / 1	(6,25)	2 / 0	(0,00)
PCR (mg/dL)	27 / 20	(74,07)	17 / 5	(29,41)
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	38 / 5	(13,16)	38 / 6	(15,79)
TGP (U/L)	56 / 4	(7,14)	54 / 5	(9,26)
TGO (U/L)	56 / 1	(1,79)	54 / 9	(16,67)
UREIA (mg/dL)	54 / 2	(3,70)	51 / 0	(0,00)

Continua

DADOS LABORATORIAIS (unidade)	SOP		CSOP		Conclusão
	N / n	(%)	N / n	(%)	
PROLACTINA (ng/mL)	47 / 6	(12,77)	22 / 4	(18,18)	
PROGESTERONA (ng/mL)	10 / 3	(30,00)	9 / 0	(0,00)	
CREATININA (mg/dL)	55 / 3	(5,45)	57 / 2	(3,51)	
SÓDIO (mmol/L)	50 / 4	(8,00)	45 / 1	(2,22)	
POTÁSSIO (mmol/L)	50 / 2	(4,00)	44 / 0	(0,00)	
CÁLCIO (mg/dL)	39 / 2	(5,13)	30 / 2	(6,67)	
MAGNÉSIO (mg/dL)	33 / 2	(6,06)	26 / 2	(7,69)	
FÓSFORO (mg/dL)	35 / 2	(5,71)	29 / 2	(6,90)	
FERRITINA (ng/mL)	31 / 18	(58,06)	11 / 4	(36,36)	
ÁCIDO FÓLICO (ng/mL)	19 / 4	(21,05)	25 / 1	(4,00)	
VITAMINA B12 (pg/mL)	21 / 1	(4,76)	19 / 1	(5,26)	

FSH: Hormônio Folículo Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; PCR: Proteína C-Reativa; S-DHEA: Sulfato de Deidroepiandrosterona; TGO: Transaminase Glutâmica Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmica Pirúvica; TSH: Hormônio Tiroestimulante; N: total de mulheres com dados para a variável analisada; n: número de mulheres com alteração da variável analisada, a partir do valor de referência.

Fonte: Autora, 2017.

2.4.5 Coleta de Sangue e Separação de Leucócitos

Foram coletados 8 mL de sangue periférico das mulheres participantes do estudo, por venopunção realizada por um técnico capacitado, e o sangue foi coletado em tubos de coleta à vácuo estéril com EDTA.

A obtenção dos leucócitos foi realizada a partir da lavagem deste sangue. Após homogeneizado, o sangue periférico das pacientes foi colocado em tubo de 50 mL, completando o volume com Tampão de Eluição - TE 20:5 (Tris HCl1M, EDTA 0,5m pH: 0,8 e Água milli Q), em seguida agitou-se os tubos e centrifugou-se por 15 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado e novamente completou-se o volume com TE. Em seguida, os tubos foram colocados no congelador por 10 minutos e depois na centrífuga por 15 minutos a 3500 rpm. Repetiu-se o processo mais 3 ou 4 vezes ou até a obtenção de um *pellet* livre de hemácias. Colocou-se TE 20:5 para completa cobertura do *pellet* de leucócitos e conservação da amostra. Logo após, os *pellets* foram armazenados em tubos de 50 mL e no congelador a -20°C até o momento da extração do DNA.

2.4.6 Extração DNA Genômico

O DNA dos leucócitos de sangue periférico dos grupos caso e controle foi extraído a partir da técnica de fenol: clorofórmio: isoalímico, segundo Sambrook e

colaboradores em 1989, com modificações e armazenado em freezer -20°C para posterior genotipagem.

A técnica de extração do DNA foi realizada a partir das seguintes etapas: as amostras armazenadas no congelador foram transferidas para tubos de 15mL e em seguida adicionado 250µL do tampão de lise celular - Solução C (Quadro 4), em cada amostra e incubadas em banho-maria a 37°C, 24 horas ou até a completa dissolução do *pellet* de leucócitos.

Quadro 5 - Reagentes usados no preparo da Solução C.

Solução C	
Solução B1X*	125µL
Água Ultra Pura	62,5µL
SDS 10%	62,5µL
Proteinase K	0,001g
* Solução B1X: 1mL de EDTA 0,5M; 500 µL de NaCl 0,5M; 500 µL de Tris-HCl 1M (pH 8,0); 48 mL de Água Ultra Pura Autoclavada.	

Fonte: Autora, 2017.

Ao término do tempo de incubação no banho-maria, foram acrescentados 1000µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) seguida de agitação lenta por 15 minutos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos. Ao término da centrifugação, foi recolhida a fase superior das amostras, e transferidas para um novo tubo de 15mL e adicionado 1000µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram novamente agitadas por 15 minutos e centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos. Após a segunda centrifugação, foram coletadas novamente a fase superior de cada amostra, em um outro tubo de 15mL e colocado 40µL de Acetato de Sódio 0,2M e 1mL de etanol 100% gelado e os tubos foram invertidos cuidadosamente para a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi transferido para um tubo de 2,0 mL e centrifugado em 2 mL de etanol 70% a 15000rpm por 10 minutos, após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi desprezado e o DNA seco em temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras de DNA foram ressuspendida em TE 20:1, e colocado em eluição em banho-maria a 37°C, por cerca de 48 horas.

2.4.7 Quantificação e Diluição das amostras de DNA

Após o DNA extraído e eluído, realizou-se a quantificação do DNA por espectrofotometria e foi efetuado a diluição das mesmas em uma concentração final

de 200 ng/ μ L. Para verificar a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, com tampão TAE (Tris Acetato EDTA). O DNA genômico foi armazenado a -20°C até momento de amplificação por PCR.

2.4.8 Análises Moleculares

A avaliação dos polimorfismos das enzimas do metabolismo do folato foi realizada pela técnica PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição). O Quadro 6 apresenta as concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR, sequências dos primers, tamanho do produto de PCR e temperatura de anelamento dos polimorfismos estudados. As descrições a seguir são referentes as condições de amplificação, digestão enzimática e visualização para cada polimorfismo:

Polimorfismo *MTHFR* C677T (rs 1801133): A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C , seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão das cadeias a 72°C por 45 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados de 198 pares de bases (pb) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed™ após eletroforese a 80 Volts, por 60 minutos e observado em luz ultravioleta. Na reação de digestão enzimática foram utilizados 8,5 μ L de água ultrapura, 1,5 μ L de Tampão, 5,0 μ L de produto de PCR e 1U de enzima de restrição. As amostras do produto PCR foram submetidas à restrição enzimática com a enzima de restrição *Hinf I* para a detecção do polimorfismo C \rightarrow T. O Quadro 7 apresenta as condições da digestão enzimática e os fragmentos gerados após o corte enzimático. A observação do genótipo foi realizada em eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, a 70 Volts, por 120 minutos.

Polimorfismo *MTHFR* A1298C (rs 1801131): A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 10 minutos a 95°C , seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão das cadeias a 72°C por 45 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados apresentaram 163pb e foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% corado com GelRed™ após eletroforese a 80 Volts, por 90 minutos e observado em luz ultravioleta. Na reação de digestão enzimática foram utilizados 8,5 μ L de água ultrapura, 1,5 μ L de Tampão, 5,0 μ L

de produto de PCR e 1U de enzima de restrição. As amostras do produto PCR foram submetidas à restrição enzimática com a enzima de restrição *Mbo II* para a detecção do polimorfismo A→C. O Quadro 7 apresenta as condições da digestão enzimática e os fragmentos gerados após o corte enzimático. A observação do genótipo foi realizada por uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, a 70 Volts, por 120 minutos.

Polimorfismo do MTR A2756G (rs 1805087): A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão das cadeias a 72°C por 45 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados apresentaram 211pb e foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com GelRed™ após eletroforese a 80 Volts, por 45 minutos e observado em luz ultravioleta. Na reação de digestão enzimática foram utilizados 8,0µL de água ultrapura, 1,5µL de Tampão, 5,0µL de produto de PCR e 5U de enzima de restrição. As amostras do produto PCR foram submetidas à restrição enzimática com a enzima de restrição *Hae III* para a detecção do polimorfismo A→G. O Quadro 7 apresenta as condições da digestão enzimática e os fragmentos gerados após o corte enzimático. A observação do genótipo foi realizada em eletroforese em gel de agarose 3%, a 80 Volts, por 120 minutos.

Polimorfismo do MTRR A66G (rs 1801394): A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão das cadeias a 72°C por 45 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados apresentaram 118pb e foram visualizados em gel de agarose 3%, após eletroforese a 80 Volts, por 45 minutos e observado em luz ultravioleta. Foi utilizado GelRed™ na aplicação dos produtos de PCR no gel. Na reação de digestão enzimática foram utilizados 8,5µL de água ultrapura, 1,5µL de Tampão, 5,0µL de produto de PCR e 1U de enzima de restrição. As amostras do produto PCR foram submetidas à restrição enzimática com a enzima de restrição *Nsp I* para a detecção do polimorfismo A→G. O Quadro 7 apresenta as condições da digestão enzimática e os fragmentos gerados após o corte enzimático. A observação do genótipo foi realizada em eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, a 70 Volts, por 120 minutos.

Polimorfismo do RFC-1 A80G (rs 1051266): A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão das cadeias a 72°C por 45 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados apresentaram 230pb e foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após eletroforese a 80 Volts, por 45 minutos e observado em luz ultravioleta. Foi utilizado GelRed™ na aplicação dos produtos de PCR no gel. Na reação de digestão enzimática foram utilizados 4,5µL de água ultrapura, 1,5µL de Tampão, 9,0µL de produto de PCR e 1U de enzima de restrição. As amostras do produto PCR foram submetidas à restrição enzimática com a enzima de restrição *Hha I* para a detecção do polimorfismo A→G. O Quadro 7 apresenta as condições da digestão enzimática e os fragmentos gerados após o corte enzimático. A observação do genótipo foi realizada em eletroforese em gel de poli-acrilamida 10%, a 70 Volts, por 120 minutos.

Quadro 6 - Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR, sequências dos primers, tamanho do produto de PCR e temperatura de anelamento dos polimorfismos estudados.

SNP's	Primers (5'- 3')	MgCl ₂ (50mM)	Produto de PCR (pb)	°C Anelamento	Ref.
MTHFR C677T	F-5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' R-5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	2,5 mM	198 pb	62°C	Coppedè et al, 2007.
MTHFR A1298C	F-5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3' R- 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'	3,0 mM	163 pb	60°C	Van der Put et al, 1998.
MTR A2756G	F- 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C- 3' R- 5'- GAT CCA AGG CCT TTT ACA CTC CTC -3'	2,5 mM	211 pb	60°C	Coppedè et al, 2007.
MTRR A66G	F- 5'-GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC-3' R- 5'-AAA CGG TAA AAT CCA CTG TAA CGG C-3'	3,0 mM	118 pb	62°C	Scazzone et al, 2009.
RFC-1 A80G	F- 5'-AGT GTC ACC TTC GTC CC-3' R- 5'-TCC CGC GTG AAG TTC TTG-3'	1,5 mM	230 pb	58°C	Coppedè et al, 2006.
*Foram usadas as seguintes concentrações nas reações de PCR para todos os SNPs estudados: DNA genômico: 200ng; Tampão (10X): 1X; dNTPs: 2mN; Primers (5'- 3') : 20 pmoles; Taq DNA Polimerase (5U/µL): 1U.					

°C: temperatura de Anelamento; **Ref.:** Referência Bibliográfica.

Fonte: Autora, 2017.

Quadro 7 - Condições utilizadas nas reações de restrição enzimática e o tamanho dos fragmentos gerados após o corte enzimático.

SNP's	Enzima de Restrição	Temperatura Digestão	Tempo Digestão	Genótipos e Fragmentos após Corte Enzimático (pb)
MTHFR C677T	Hinf I - 1U	37°C	12 horas	CC- 198pb; CT- 198, 175 e 23pb; TT- 175 e 23 pb.
MTHFR 1298C	Mbo II - 1U	37°C	2 horas	AA- 56, 31, 30, 28 e 18pb; AC- 84, 56, 31, 30, 28 e 18pb; CC- 84, 31, 30, e 18pb.
MTR A2756G	Hae III - 5U	37°C	3 horas	AA-211pb; AG-211, 131 e 80pb; GG- 131 e 80pb.
MTRR A66G	Nsp I - 1U	37°C	2 horas	AA- 118pb; AG- 118, 94 e 24pb; GG- 94 e 24pb.
RFC-1 A80G	Hha I - 1U	37°C	3 horas	AA- 162 pb; AG- 162, 125, 68 e 37pb; GG- 125, 68 e 37pb.

Fonte: Autora, 2017.

2.4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas de computador BioEstat 3.0 e Stats Direct. Estatísticas descritivas incluíram valores médios \pm desvio padrão para dados contínuos e porcentagem para dados categóricos. O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para a comparação para as diferenças das distribuições genotípicas e testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os modelos de regressão logística múltipla foram utilizados para determinar o efeito das variáveis analisadas em SOP, incluindo fatores de risco para a síndrome e dados moleculares.

Os modelos incluíram para os seguintes dados: hábito tabagista (referência: não fumante), hábito etilista (referência: não ingerir bebida alcoólica) e histórico de SOP familiar (referência: não). E para os dados moleculares foram inclusos os polimorfismos estudados (referência: genótipo do homocigoto do tipo selvagem).

O software G POWER 3.1 foi usado para verificar o poder estatístico do estudo e apresentou 95%, *post hoc*.

O programa SNPStats (disponível em: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web) foi utilizado para o modelo de regressão logística ajustado para a idade e também avaliar a associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento de SOP. O efeito dos polimorfismos foi avaliado pelos modelos de: 1- Codominância (homocigoto tipo selvagem \times heterocigótico \times homocigoto polimórfico); 2-Dominância (homocigoto tipo selvagem \times heterocigótico +

homozigoto polimórfico); 3- Recessivo (homozigoto polimórfico \times homozigoto tipo selvagem + heterozigótico) e 4- Sobredominância (homozigoto tipo selvagem + homozigoto polimórfico \times heterozigoto). O haplótipo do gene *MTHFR* foi inferido usando o programa SNPStats, verificando a frequência populacional estimada dos haplótipos.

Os resultados do modelo de regressão logística, foram apresentados em *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC-95%). O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

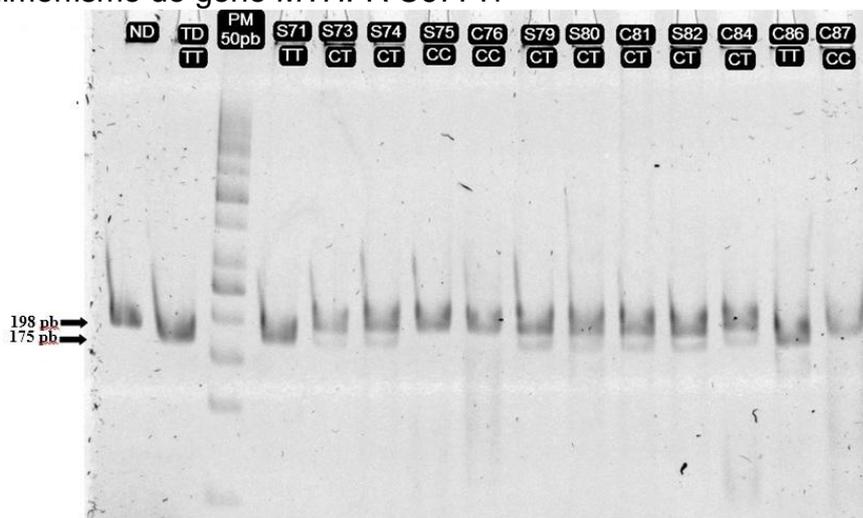
2.5 RESULTADOS

2.5.1 Análise do polimorfismo do gene *MTHFR* C677T (rs 1801133)

Na análise do polimorfismo do gene *MTHFR* C677T foram genotipadas amostras 99 casos e 102 controles, totalizando 201 amostras.

Após digestão enzimática, os genótipos gerados foram: Homozigoto tipo selvagem - CC (198pb), Heterozigoto - CT (198, 175 e 23pb) e Homozigoto polimórfico - TT (175 e 23 pb), na Figura 6 está apresentado a foto representativa do gel de poliácridamida. O fragmento com 23pb não foi visualizado.

Figura 6 – Foto representativa do gel de poliácridamida 10%, com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene *MTHFR* C677T.



Genótipo **CC**: Homozigoto tipo selvagem; Genótipo **CT**: Heterozigoto; Genótipo **TT**: Homozigoto polimórfico; **PM**-Peso Molecular com 50 pares de bases (pb); **ND**- produto de PCR que não sofreu digestão enzimática; **TD**- Produto totalmente digerido.

Fonte: Autora, 2017.

A Tabela 3 apresenta a análise univariada das frequências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *MTHFR* C677T em mulheres com SOP e controles. A frequência genotípica desse polimorfismo não apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos ($\chi^2= 1,14$; $p= 0,56$).

Tabela 3 – Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para do polimorfismo do gene *MTHFR* C677T. Uberaba, MG – 2017.

	SOP N (%)	CSOP N (%)	χ^2	p
Frequência Genotípica				
CC	46 (46,5)	41 (40,2)	1,14	0,56
CT	44 (44,4)	48 (47,1)		
TT	09 (09,1)	13 (12,7)		
Frequência Alélica				
C	0,69	0,64		
T	0,31	0,36		

Fonte: Autora, 2017.

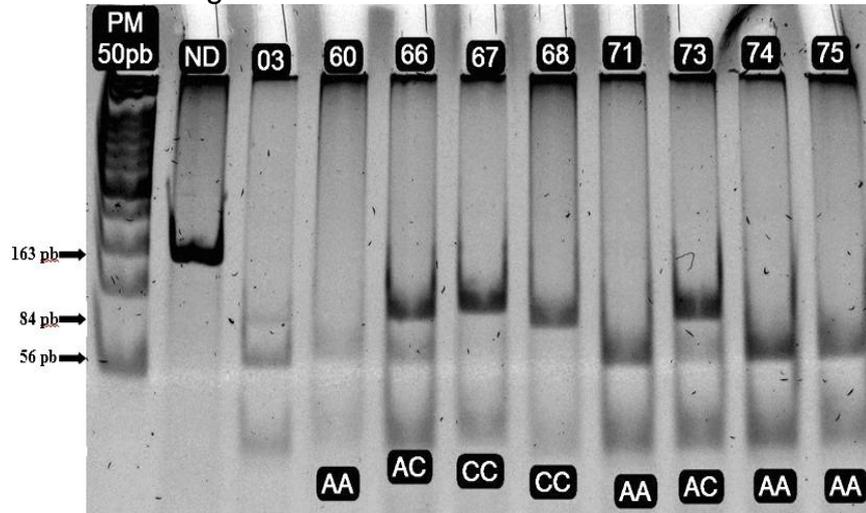
O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado pelo teste do χ^2 e mostrou que a distribuição genotípica desse polimorfismo está em equilíbrio para os dois grupos ($\chi^2 = 0,11$; $p = 0,74$ casos, e $\chi^2 = 0,03$; $p = 0,86$, controles).

2.5.2 Análise do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C (rs 1801131)

Na análise do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C foram genotipadas amostras 99 casos e 104 controles, totalizando 203 amostras.

Após digestão enzimática, os genótipos gerados foram: Homozigoto tipo selvagem - AA (56, 31, 30, 28 e 18pb), Heterozigoto - AC (84, 56, 31, 30, 28 e 18pb) e Homozigoto polimórfico - CC (84, 31, 30 e 18pb), a Figura 7 mostra a foto representativa de um gel de poliacrilamida desses genótipos. Os fragmentos de 31, 30, 28 e 18 pb não foram visualizados.

Figura 7 – Foto representativa do gel de poliacrilamida 10% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C.



Genótipo **AA**: Homozigoto tipo selvagem; Genótipo **AC**: Heterozigoto; Genótipo **CC**: Homozigoto polimórfico; **PM**-Peso Molecular com 50 pares de bases (pb); **ND**- produto de PCR que não sofreu digestão enzimática.

Fonte: Autora, 2017.

A Tabela 4 apresenta a análise univariada das frequências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C em mulheres com SOP e controles. A frequência genotípica desse polimorfismo não apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos ($\chi^2= 0,04$; $p= 0,98$).

Tabela 4 – Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C. Uberaba, MG - 2017.

	SOP N (%)	CSOP N (%)	χ^2	p
Frequência Genotípica				
AA	51 (51,5)	55 (52,9)	0,04	0,98
AC	31 (31,3)	32 (30,8)		
CC	17 (17,2)	17 (16,3)		
Frequência Alélica				
A	0,67	0,68		
C	0,33	0,32		

Fonte: Autora, 2017.

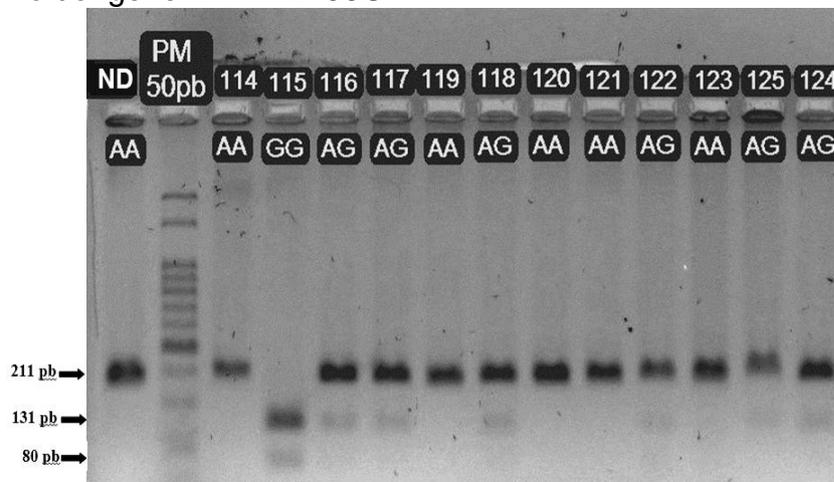
O EHW mostrou que a distribuição genotípica desse polimorfismo está em desequilíbrio para os dois grupos ($\chi^2= 8,33$; $p = 0,004$ casos, e $\chi^2 = 8,73$; $p = 0,003$, controles).

2.5.3 Análise do polimorfismo do gene *MTR A2756G* (rs 1805087)

Na análise do polimorfismo do gene *MTR A2756G* foram genotipadas amostras 99 casos e 103 controles, totalizando 202 amostras.

Após digestão enzimática, os genótipos gerados foram: Homozigoto tipo selvagem - AA (211pb), Heterozigoto - AG (211 e 80pb) e Homozigoto polimórfico - GG (80pb), e estão apresentados na foto representativa do gel de agarose da Figura 8.

Figura 8 – Foto representativa do gel de agarose 3% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene *MTR A2756G*.



Genótipo **AA**: Homozigoto tipo selvagem; Genótipo **AG**: Heterozigoto; Genótipo **GG**: Homozigoto polimórfico; **PM**-Peso Molecular com 50 pares de bases (pb); **ND**- produto de PCR que não sofreu digestão enzimática.

Fonte: Autora, 2017.

A análise univariada das frequências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *MTR A2756G* dos casos e controles está apresentada na Tabela 5. A frequência genotípica desse polimorfismo não apresentou significância estatística entre os grupos ($\chi^2= 0,13$; $p= 0,57$).

Tabela 5 – Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para do polimorfismo do gene *MTR A2756G*. Uberaba, MG - 2017.

	SOP N (%)	CSOP N (%)	χ^2	p
Frequência Genotípica				
AA	63 (63,6)	58 (56,3)	0,13	0,57
AG	32 (32,3)	40 (38,8)		
GG	04 (04,0)	05 (04,9)		

Continua

			Conclusão	
			SOP	CSOP
			N (%)	N (%)
Frequência Alélica				
A			0,80	0,76
G			0,20	0,24

Fonte: Autora, 2017.

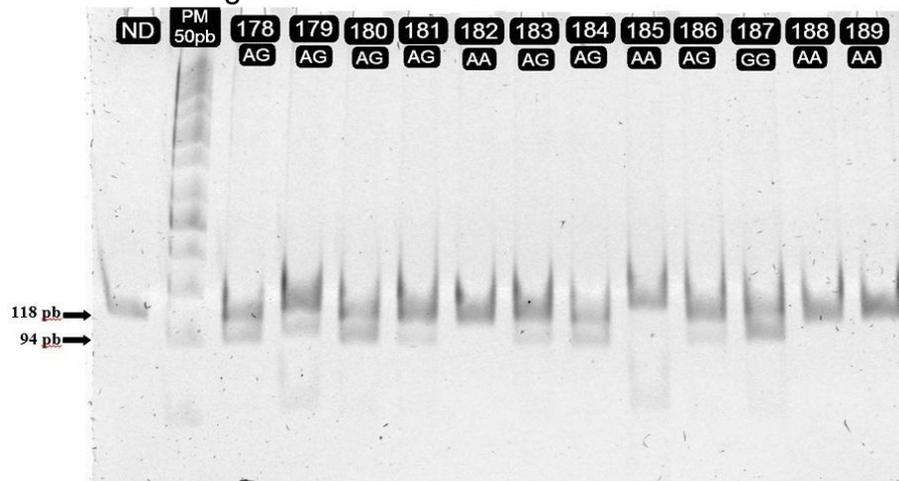
O EHW mostrou que a distribuição genotípica desse polimorfismo está em equilíbrio para os dois grupos ($\chi^2=0,0006$; $p= 0,98$, casos, e $\chi^2 = 0,33$; $p = 0,57$, controles).

2.5.4 Análise do polimorfismo do gene *MTRR* A66G (rs 1801394)

O polimorfismo do gene *MTRR* A66G foi analisado através da genotipagem de 99 amostras de mulheres com SOP e 103 controles, totalizando 202 amostras.

Após digestão enzimática, os genótipos gerados foram: Homozigoto tipo selvagem - AA (118pb), Heterozigoto - AG (118, 94 e 24pb) e Homozigoto polimórfico - GG (94 e 24pb), e a Figura 9 apresenta a foto do gel de poliácridamida representativo desses genótipos. O fragmento com 24pb não foi visualizado.

Figura 9 – Foto representativa do gel de poliácridamida 12% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene *MTRR* A66G.



Genótipo **AA**: homozigoto tipo selvagem; Genótipo **AG**: heterozigoto; Genótipo **GG**: homozigoto polimórfico; **PM**-Peso Molecular com 50 pares de bases (pb); **ND**- produto de PCR que não sofreu digestão enzimática.

Fonte: Autora, 2017.

A análise univariada das frequências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *MTR* A66G dos dois grupos estudados está apresentada na Tabela 6. A

frequência genotípica desse polimorfismo não apresentou significância estatística entre os grupos ($\chi^2= 3,47$; $p= 0,18$).

Tabela 6 – Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para do polimorfismo do gene *MTRR* A66G. Uberaba, MG - 2017.

	SOP N (%)	CSOP N (%)	χ^2	p
Frequência Genotípica				
AA	34 (34,3)	27 (26,2)	3,47	0,18
AG	57 (57,6)	60 (58,3)		
GG	08 (08,1)	16 (15,5)		
Frequência Alélica				
A	0,63	0,55		
G	0,37	0,45		

Fonte: Autora, 2017.

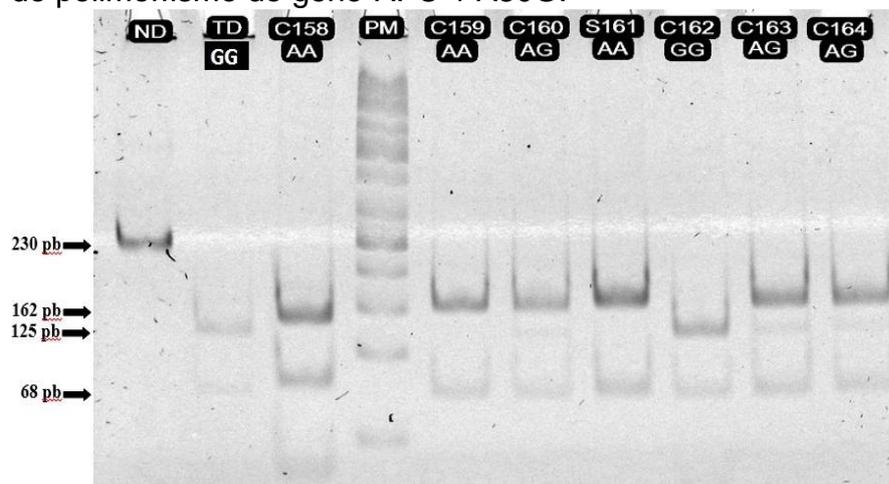
O EHW mostrou que a distribuição genotípica desse polimorfismo não está em equilíbrio para o grupo de mulheres com SOP ($\chi^2=5,55$; $p= 0,02$) e está em equilíbrio para o grupo controle ($\chi^2 = 3,28$; $p =0,07$).

2.5.5 Análise do polimorfismo do gene *RFC-1* A80G (rs 1051266)

A avaliação do polimorfismo do gene *RFC-1* A80G foi realizado pela genotipagem de 95 casos e 98 controles, totalizando 193 amostras.

Após digestão enzimática, os genótipos gerados foram: Homozigoto tipo selvagem - AA (162 e 58pb), Heterozigoto - AG (162, 125, 68 e 37pb) e Homozigoto polimórfico - GG (125, 68 e 37pb), e estão apresentados na foto do gel de poli-acrilamida representativo da Figura 10. O fragmento com 37pb não foi visualizado.

Figura 10 - Foto representativa do gel de poliacrilamida 10% com os produtos da PCR-RFLP do polimorfismo do gene *RFC-1* A80G.



Genótipo **AA**: Homozigoto tipo selvagem; Genótipo **AG**: Heterozigoto; Genótipo **GG**: Homozigoto polimórfico; **PM**-Peso Molecular com 50 pares de bases (pb); **ND**- produto de PCR que não sofreu digestão enzimática; **TD**- Produto totalmente digerido.

Fonte: Autora, 2017.

A análise univariada das frequências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *RFC-1* A80G das mulheres com SOP e controles está apresentada na Tabela 7. A frequência genotípica desse polimorfismo apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($\chi^2 = 8,42$; $p = 0,01$).

Tabela 7 – Frequências genotípica e alélica das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP) para do polimorfismo do gene *RFC-1* A80G. Uberaba, MG - 2017.

	SOP N (%)	CSOP N (%)	χ^2	p
Frequência Genotípica				
AA	37 (39,0)	26 (26,5)	8,42	0,01*
AG	29 (30,5)	50 (51,0)		
GG	29 (30,5)	22 (22,5)		
Frequência Alélica				
A	0,54	0,52		
G	0,46	0,48		

* $p < 0,05$

Fonte: Autora, 2017.

O EHW mostrou que a distribuição genotípica desse polimorfismo está em desequilíbrio para o grupo de mulheres com SOP ($\chi^2 = 14,01$; $p = 0,0002$, casos) e está em equilíbrio para o grupo controle ($\chi^2 = 0,05$; $p = 0,83$).

2.5.6 Análise do Haplótipo do gene *MTHFR*

A Tabela 8 apresenta os haplótipos que foram construídos com a análise dos dois polimorfismos do gene *MTHFR* avaliados nesse estudo (C677T e A1298C), com a utilização do programa SNPStat. Foi investigada a associação desses haplótipos para verificar a suscetibilidade à SOP. A frequência do haplótipo T-C apresentou diferença estatística significativa entre as mulheres com SOP e controles (OR = 0,19; IC 95% - 0,04 a 0,93 e $p=0,042$), com maior frequência no grupo controle. Enquanto que os haplótipos C-A, T-A e C-C apresentaram frequências semelhantes entre os dois grupos.

Tabela 8 - Frequência dos Haplótipos dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* das mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP). Uberaba, MG - 2017.

Haplótipo	Frequência SOP	Frequência CSOP	O.R (IC-95%)	p
C-A	0,38	0,39	1,00	-
T-A	0,29	0,29	1,07 (0,62-1,82)	0,82
C-C	0,31	0,26	1,53 (0,91-2,56)	0,11
T-C	0,02	0,07	0,19 (0,04-0,93)	0,042*

O.R - Odds Ratio. IC – Intervalo de Confiança. * $p < 0,05$.

Fonte: Autora, 2017.

2.5.7 Análise de associação dos polimorfismos estudados

A Tabela 9 apresenta a análise de associação dos cinco polimorfismos avaliados nesse estudo, e foi realizado pelo programa SNPStat. Foram analisados os genótipos dos genes estudados em 183 mulheres, 93 com SOP e 90 controles, ajustando-se para a idade. O polimorfismo *MTRR* A66G apresentou diferenças estatística entre os grupos para o modelo Recessivo (OR= 2,97; IC 95% - 1,04 a 8,50; $p=0,035$), com uma frequência maior de recessivos no grupo controle. O polimorfismo do gene *RFC-1* A80G apresentou diferenças significativas entre os grupos para o modelo de Codominância (OR = 2,39; IC 95% – 1,15 a 5,00; $p=0,049$) e Sobredominância (OR = 2,15; IC 95% - 1,14 a 4,07; $p= 0,017$), com maior frequência de heterizogotos nas mulheres do grupo controle. Esses resultados podem sugerir um papel protetor para a síndrome.

Tabela 9 - Associação dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *RFC-1* A80G com SOP, ajustado para a idade. Uberaba, MG – 2017.

Modelo	Genótipo	Caso N (%)	Controle N (%)	O.R (IC - 95%)	p
<i>MTHFR</i> C677T					
Codominância	C/C	44 (47,30)	39 (43,30)	1,00	0,32
	C/T	42 (45,20)	39 (43,30)	1,11 (0,58-2,12)	
	T/T	07 (07,50)	12 (13,40)	2,24 (0,77-6,50)	
Dominância	C/C	44 (47,30)	39 (43,30)	1,00	0,45
	C/T-T/T	49 (52,70)	51 (56,70)	1,27 (0,68-2,35)	
Recessivo	C/C-C/T	86 (92,50)	78 (86,70)	1,00	0,14
	TT	07 (07,50)	12 (13,40)	2,13 (0,77-5,88)	
Sobredominância	C/C-T/T	51 (54,80)	51 (56,70)	1,00	0,87
	C/T	42 (45,20)	39 (43,30)	0,95 (0,51-1,76)	
<i>MTHFR</i> A1298C					
Codominância	A/A	48 (51,60)	48 (53,30)	1,00	0,60
	A/C	29 (31,20)	27 (30,00)	0,70 (0,34-1,43)	
	C/C	16 (17,20)	15 (16,70)	0,79 (0,34-1,86)	
Dominância	A/A	48 (51,60)	48 (53,30)	1,00	0,33
	A/C-C/C	45 (48,40)	42 (46,70)	0,73 (0,39-1,37)	
Recessivo	A/A-A/C	77 (82,80)	75 (83,30)	1,00	0,81
	C/C	16 (17,20)	15 (16,70)	0,91 (0,40-2,04)	
Sobredominância	A/A-C/C	64 (68,80)	63 (70,00)	1,00	0,39
	A/C	29 (31,20)	27 (30,00)	0,74 (0,37-1,47)	
<i>MTR</i> A2756G					
Codominância	A/A	59 (63,40)	54 (60,00)	1,00	0,71
	A/G	31 (33,30)	31 (34,40)	1,17 (0,61-2,23)	
	G/G	03 (03,20)	05 (05,60)	1,80 (0,38-8,39)	
Dominância	A/A	59 (63,40)	54 (60,00)	1,00	0,53
	A/G-G/G	34 (36,60)	36 (40,00)	1,22 (0,65-2,29)	
Recessivo	A/A-A/G	90 (96,80)	85 (94,40)	1,00	0,49
	GG	03 (03,20)	05 (05,60)	1,70 (0,37-7,79)	
Sobredominância	A/A-G/G	62 (66,70)	59 (65,60)	1,00	0,73
	A/G	31 (33,30)	31 (34,40)	1,12 (0,59-2,13)	
<i>MTRR</i> A66G					
Codominância	A/A	33 (35,50)	25 (27,80)	1,00	0,09
	A/G	54 (58,10)	51 (56,70)	1,24 (0,62-2,45)	
	G/G	06 (06,50)	14 (15,60)	3,40 (1,09-10,67)	
Dominância	A/A	33 (35,50)	25 (27,80)	1,00	0,28
	A/G-G/G	60 (64,50)	65 (72,20)	1,44 (0,74-2,79)	
Recessivo	A/A-A/G	87 (93,50)	76 (84,40)	1,00	0,035*
	GG	06 (06,50)	14 (15,60)	2,97 (1,04-8,50)	
Sobredominância	A/A-G/G	39 (41,90)	39 (43,30)	1,00	0,77
	A/G	54 (58,10)	51 (56,70)	0,91 (0,49-1,69)	
<i>RFC-1</i> A80G					
Codominância	A/A	36 (38,70)	25 (27,80)	1,00	0,049*
	A/G	28 (30,10)	45 (50,00)	2,39 (1,15-5,00)	
	G/G	29 (31,20)	20 (22,20)	1,26 (0,56-2,84)	
Dominância	A/A	36 (38,70)	25 (27,80)	1,00	0,066
	A/G-G/G	57 (61,30)	65 (72,20)	1,85 (0,95-3,60)	

Continua

					Conclusão
Modelo	Genótipo	Caso N (%)	Controle N (%)	O.R (IC - 95%)	p
RFC-1 A80G					
Recessivo	A/A-A/G	64 (68,80)	70 (77,80)	1,00	0,49
	GG	29 (31,20)	20 (22,20)	0,78 (0,39-1,57)	
Sobredominância	A/A-G/G	65 (69,90)	45 (50,00)	1,00	0,017*
	A/G	28 (30,10)	45 (50,00)	2,15 (1,14-4,07)	

Odds Ratio (OR) ajustado para idade. IC – Intervalo de Confiança. *p <0,05.

Fonte: Autora, 2017.

2.5.8 Análise da Regressão Logística Múltipla

A Tabela 10 mostra os resultados do teste de regressão logística múltipla realizado com dados de 85 mulheres com SOP e 84 controles, que possuíam todos os dados completos. Foram utilizados os fatores de risco para SOP (hábito tabagista e etilista e histórico de SOP familiar) e os polimorfismos estudados.

Nessa análise, as variáveis tabagismo (OR = 0,13 ; IC 95% - 0,04 a 0,41 ; p = 0,004) e histórico de SOP familiar (OR = 3,29; IC 95% - 1,48 a 7,31; p = 0,003), apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos, sendo que o histórico de SOP na família apresentou mais frequente nas mulheres com SOP.

Tabela 10 - Distribuição de fatores de riscos para SOP e os polimorfismos estudados de mulheres com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) e controles (CSOP). Uberaba, MG - 2017.

VARIÁVEL ANALISADA	SOP N (%)	CSOP N (%)	O.R (IC-95%)	p
FATORES DE RISCO				
Tabagismo				
Sim	05 (05,88)	23 (27,38)	0,13 (0,04-0,41)	0,004*
Não	80 (94,11)	61 (72,62)		
Etilismo				
Sim	20 (23,53)	24 (28,57)	0,96(0,44-2,07)	0,91
Não	65 (76,47)	60 (71,43)		
Histórico SOP Familiar				
Sim	31 (36,47)	14 (16,67)	3,29 (1,48-7,31)	0,003*
Não	54 (63,53)	70 (83,33)		
POLIMORFISMOS				
MTHFR A1298C				
AA	42 (49,41)	46 (54,76)	1,06 (0,53-2,13)	0,87
AC / CC	43 (50,59)	38 (45,24)		
MTHFR C677T				
CC	40 (47,06)	37 (44,05)	1,01 (0,50-2,01)	0,98
CT / TT	45 (52,94)	47 (55,95)		

Continua

VARIÁVEL ANALISADA	SOP N (%)	CSOP N (%)	O.R (IC-95%)	Conclusão
				p
MTR A2756G				
AA	52 (61,18)	51 (60,71)	0,85 (0,43-1,68)	0,64
AG / GG	33 (38,82)	33 (39,29)		
MTRR A66G				
AA	32 (37,65)	23 (27,38)	0,67 (0,33-1,36)	0,26
AG / GG	53 (62,35)	61 (72,62)		
RFC-1 A80G				
AA	35 (41,18)	24 (28,57)	0,52 (0,25- 1,06)	0,07
AG / GG	50 (58,82)	60 (71,43)		

O.R- Odds Ratio; IC - intervalo de confiança. Para a distribuição dos polimorfismos estudados e fatores de risco para SOP foram utilizados os modelos de regressão logística múltipla. Os resultados foram apresentados em OR e IC – 95%. *p ≤ 0,05.

Fonte: Autora, 2017.

2.6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a associação de cinco polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do folato (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *RFC-1* A80G) em mulheres com SOP e controles em uma população brasileira. Conforme as evidências demonstraram, a SOP é uma doença multifatorial, assim torna-se importante considerar que os fatores genéticos também estão relacionados com a etiologia da síndrome (KOSOVA; URBANEK, 2013; VEKATESH et al, 2014; SHIM et al, 2015; JONES; GOOZARDI, 2016; ZHAO et al, 2016).

Por ser uma doença endocrinológica, os estudos relacionados aos genes de vias metabólicas podem auxiliar no entendimento do desenvolvimento da SOP. Portanto, analisar os polimorfismos dos genes de enzimas da via metabólica do folato podem fornecer dados relevantes de como essas variantes genéticas poderiam modular as propriedades estruturais ou funcionais das enzimas, e acarretar para alterações importantes como as mudanças nos padrões de metilação do DNA (NASKI et al, 2014; KANDI; VADAKEDATH, 2015), que pode influenciar na regulação de genes envolvidos na etiologia ou nos sinais clínicos e/ou bioquímicos da síndrome (ILLIE; GEORGESCOU, 2015; YU et al, 2015; PRUKSANANONDA et al, 2016), e também na elevação dos níveis de homocisteína, que pode estar associada com a síndrome, por si, ou nas complicações da SOP (BADAWY et al, 2007; GUZELMERIC et al, 2007; PALEP-SINGH et al, 2008; BERKER et al, 2009; IDALI et al, 2012; SALEHPOUR et al, 2011; SEN et al, 2011).

Nesse estudo, não foram observados associações entre SOP e os SNPs C677T e A1298C no gene *MTHFR*. Para o polimorfismo *MTHFR*C677T, os resultados deste trabalho estão de acordo com os outros estudos que avaliaram a associação entre esse polimorfismo e SOP (GLUECK et al 1999; SILLS et al, 2001; TSANADIS et al, 2002; ORIO et al, 2003; PALEP-SINGH et al, 2007; CHOI et al, 2009; KARADENIZ et al, 2010; CARLUS et al, 2016; OZEGOWSKA et al, 2016; SZAFAROWSKA et al, 2016). Quatro meta-análises avaliaram a associação entre o SNP C677T no gene *MTHFR* e SOP (BAGOS, 2009; LEE; SONG, 2014; FU et al, 2014; CARLUS et al, 2016). Na meta-análise de Fu e colaboradores (2014), houve a análise de 9 estudos de caso-controle, incluindo 638 casos e 759 controles, que compararam as mulheres das populações europeias e asiáticas. Os pesquisadores concluíram que há uma

associação do genótipo TT e SOP em mulheres europeias que em asiáticas. As outras meta-análises não encontraram associação do polimorfismo C677T no gene *MTHFR* e a síndrome, o que está de acordo com os resultados deste trabalho.

Em 2012, Idali e colaboradores realizaram um estudo em mulheres iranianas, com 71 pacientes e 106 controles, e demonstraram uma associação de perda recorrente de gravidez (RLP, do inglês *Recurrent pregnancy loss*) e SOP com o polimorfismo C677T no gene *MTHFR*. Esses pesquisadores encontraram maior ocorrência dos genótipos CT e TT em mulheres com SOP e RLP, portanto, o alelo polimórfico estava mais frequente em SOP adicionada com RLP. Qi e colaboradores (2015) realizaram um estudo com 173 mulheres chinesas, 115 com SOP e 58 controles, e encontraram que os genótipos CT e TT estavam associados ao risco aumentado para SOP. Além disso, os autores desse estudo associaram o genótipo TT e o risco aumentado de resistência insulínica no grupo de mulheres com SOP, quando comparados com o genótipo CC. O trabalho de Wu e colaboradores (2016) investigou o SNP C677T no gene *MTHFR* e SOP em uma população chinesa, o estudo teve a participação de 244 mulheres com SOP e 257 controles, eles também evidenciaram a associação do genótipo TT e o alelo T com o risco aumentado para a síndrome em uma população estudada. Jain e colaboradores (2012) não evidenciou a relação entre SOP e o polimorfismo 677T do gene *MTHFR*, como em nosso estudo, mas esses autores demonstraram a associação entre o polimorfismo e suscetibilidade com hiperlipidemia em mulheres com a síndrome.

Na literatura há poucos trabalhos que investigaram a relação entre o polimorfismo A1298C no gene *MTHFR* e SOP. Neste estudo, não foi observada associação do polimorfismo A1298C no gene *MTHFR* e SOP, o que está de acordo com outros estudos (PALEP-SINGH et al, 2007; QI et al, 2015; SZAFAROWSKA et al, 2016). Porém, o resultado deste estudo é contraditório com dois trabalhos encontrados na literatura. Idali e colaboradores (2012) observaram uma associação dessa variante genética e SOP e RLP, na população iraniana estudada. Wu e colaboradores (2016) apresentaram a associação entre a variante 1298C do gene *MTHFR* e risco elevado do desenvolvimento de SOP na população avaliada.

Dois estudos avaliaram os dois polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) em populações e períodos diferentes, e evidenciaram a associação entre esses polimorfismos e SOP, assim essas variantes do gene *MTHFR* podem desempenhar um relevante papel na etiologia e patogênese da doença. (IDALI et al,

2012; WU et al, 2016), o que não está de acordo com os resultados do presente estudo, que não demonstraram essa associação dessas duas variantes do gene *MTHFR*.

Na análise da frequência dos haplótipos dos polimorfismos do gene *MTHFR* estudados nesse trabalho e SOP, houve uma diferença entre os grupos para o haplótipo T-C, evidenciando uma maior frequência no grupo controle. Até o momento, não há na literatura trabalhos que relacionaram análise de haplótipo do gene *MTHFR* em SOP, este pode ser o primeiro estudo que investigou essa associação. O termo haplótipo pode ser definido como a combinação de alelos de múltiplos *loci* localizados no mesmo cromossomo homólogo, e podem ser herdados juntos (GRIFFITHS et al, 2013). Os haplótipos surgem como um atributo intrínseco da variação genética populacional (CLARK, 2004), além disso as análises baseadas em haplótipos pode apresentar melhores resultados para verificar a suscetibilidade de doenças por múltiplos alelos comparado com a análise de apenas um SNP (MORRIS; KAPLAN, 2002). Um estudo identificou que há uma troca de bases de T para C na posição 1317 (*MTHFR* T1317C). Porém o SNP *MTHFR* T1317C está localizado próximo a posição do polimorfismo A1298C no gene *MTHFR*, e a enzima de restrição utilizada na metodologia para genotipagem do polimorfismo *MTHFR* A1298C, a *Mbo* II, apresenta um sítio de reconhecimento para o polimorfismo *MTHFR* T1317C, e após o corte enzimático, os fragmentos gerados têm tamanhos similares, e pode ocorrer dificuldade na distinção entre os alelos A do SNP *MTHFR* A1298C e o alelo C do SNP *MTHFR* T1317C (WEISBERG et al, 1998; SIBANI et al, 1999). Nosso trabalho não realizou a genotipagem deste polimorfismo, entretanto um estudo realizado em 2008, na população brasileira, verificou a genotipagem do SNP *MTHFR* A1298C por duas técnicas, pela técnica PCR-RFLP e sequenciamento, e não foram observadas diferenças entre as duas técnicas (de ALVARENGA et al, 2008), sendo possível a utilização da técnica de PCR-RFLP para a genotipagem do polimorfismo *MTHFR* A1298C.

Existe uma grande relevância em estudos que combinaram a associação de SNPs e análise de haplótipos em SOP. Alguns estudos relacionados com genes que codificam proteínas envolvidas com crescimento e proliferação celular (*TGF- β* e *VEGF-A*) e funções reprodutivas (*INSL3* e *SHBG*) demonstraram que além de um determinado genótipo ou alelo, por si, estar associado ao risco elevado de desenvolver a síndrome ou apresentar fenótipos relacionados à SOP, a abordagem

por haplótipo também permitiu avaliar o efeito de múltiplos alelos na etiologia ou prevalência da doença (SHAIKH et al, 2015; YANG et al, 2015; ABU-HIJLEH et al, 2016; ROH et al, 2016; SALEM et al, 2016).

O presente estudo não encontrou associação entre o polimorfismo no gene *MTR A2756G* e SOP e este resultado está concordante ao trabalho de Palep-Singh e colaboradores (2008). Esses autores realizaram um estudo com 71 mulheres, 46 com SOP e 25 controles, categorizadas em duas etnias: brancas caucasianas (25 SOP e 16 controles) e sul-asiáticas (21 SOP e 9 controles), e investigaram este polimorfismo em mulheres com SOP, juntamente com outros parâmetros bioquímicos, hematológicos, endocrinológicos e níveis de homocisteína plasmática. Nesse estudo não foi observada a associação desse polimorfismo e a síndrome, porém associaram o genótipo AA aos níveis elevados de homocisteína no grupo com SOP. Contudo, há pesquisas que demonstraram associação entre essa variante e algumas das consequências que podem ocorrer em SOP, como hiperhomocisteinemia (LARAQUI et al, 2006) e risco de desenvolver doenças cardiovasculares (SING; LELE, 2012; RAINA et al, 2016).

Este estudo não realizou a avaliação categorizada por etnias. A população brasileira possui uma heterogeneidade genômica decorrente do processo de miscigenação desde “descobrimento” do país. Por meio do estudo de Pena e colaboradores (2000) que analisou o DNA mitocondrial e do cromossomo Y, o brasileiro tem descendência de três etnias principalmente: indígena, africana e europeia, e assim esses autores concluíram que no Brasil a população é miscigenada. É importante considerar que os estudos de SNPs são complexos, pois em uma determinada população os polimorfismos podem estar associados ou não com doenças, enquanto que em outra população, os resultados podem se apresentar contraditórios (TANAKA et al, 2014). Devido essa intensa “mistura gênica”, os estudos de variantes genéticas realizadas em nossa população pode apresentar resultados diferentes daqueles feitos em outros países.

Na análise do polimorfismo A66G no gene *MTRR*, não foi encontrada associação entre o polimorfismo e SOP. Mas a avaliação deste SNP, com ajuste para a idade, apresentou diferença significativa entre os grupos para o modelo de herança recessiva e o genótipo GG mais frequente no grupo controle. O maior número de indivíduos homozigotos recessivos no grupo controle pode estar relacionado a um efeito protetor deste genótipo na população estudada. Na literatura, até o momento

não há estudos que avaliaram o polimorfismo A66G no gene *MTRR* e SOP. Há várias pesquisas que avaliaram este SNP e algumas das consequências clínicas da síndrome: hiperhomocisteinemia (LARAQUI et al, 2006), disfunções metabólicas (JIANG et al, 2014; YANG et al, 2014; LI et al, 2015; ZHI et al, 2016) e aborto espontâneo (ZHU, 2015). Apenas o trabalho de Jiang e colaboradores (2014) associou o genótipo GG com os baixos níveis de colesterol e LDL comparados com os outros genótipos. Em todos os outros estudos, o alelo polimórfico G estava relacionado com as disfunções citadas. Para as doenças associadas à SOP, como doenças cardiovasculares e obesidade, no estudo de Lakshmi e colaboradores (2011) foi evidenciado risco elevado de desenvolver doenças cardiovasculares para o polimorfismo A66G no gene *MTRR*, e Terruzzi e colaboradores (2007) associou o genótipo AG com risco aumento para desenvolver obesidade.

A distribuição genotípica da análise univariada do polimorfismo A80G no gene *RFC-1* apresentou diferença significativa entre casos e controles, entretanto quando avaliado o polimorfismo por análise multivariada, onde foram inclusos todos os outros parâmetros, não foram observadas diferenças entre os grupos. Quando analisada associação entre o polimorfismo e SOP, ajustado para a idade, nos modelos de herança de Codominância e Sobredominância também evidenciou-se diferenças entre os grupos e o genótipo AG mais frequentes no grupo controle. Esses resultados sugerem que os indivíduos heterozigóticos pode apresentar efeito protetor para SOP, na população avaliada. Na literatura não há relatos da avaliação entre o SNP A80G do gene *RFC-1* e SOP, como também, há poucos estudos desse polimorfismo e alguns dos fenótipos ou consequências que podem ocorrer na síndrome, como hiperhomocisteinemia e aborto ou perda recorrente de gravidez.

Sukla e Raman (2012) realizaram um estudo caso-controle em que avaliaram a contribuição de SNPs da via do metabolismo de Hcy e folato (*MTHFR*, *MTR*, *CBS* e *RFC-1*) nos níveis de Hcy e também verificaram a relação de vitaminas e o efeito dos genótipos, em uma população indiana. Os pesquisadores concluíram que somente o SNP *RFC-1* A80G não interferiu nos níveis aumentados de Hcy, mas o genótipo AA apresentou relação com os níveis baixos de Hcy. O alelo polimórfico G combinado com os alelos polimórficos do gene *MTHFR* (677T e 1298C) poderiam interferir nos níveis de Hcy, portanto a combinação dos SNPs do *MTHFR* (C677T e A1298C) e *RFC-1* 80G estavam associados com alterações nos níveis de Hcy na população estudada. Em um outro estudo, Li Luo e colaboradores (2015) avaliaram

polimorfismos do metabolismo do folato (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *RFC-1*) e perda recorrente de gravidez, e concluíram que a combinação dos alelos *MTHFR* 677T e 1298A, *MTR* 2756A, *MTRR* 66A e *RFC-1* 80G estavam associados com aumento do risco de perda recorrente de gravidez. Quando realizada a análise multivariada, com todos os polimorfismos e os fatores sociodemográficos e clínicos, não foram observadas a associação entre polimorfismo *RFC-1* A80G e SOP.

O presente estudo testou o EHW para as frequências genóticas dos cinco polimorfismos analisados, os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTR* A2756G estão em equilíbrio nos dois grupos, já para o polimorfismo *MTHFR* A1298C há o desequilíbrio nos casos e controles, e os polimorfismos *MTRR* A66G e *RCF-1* A80G apresentou-se em desequilíbrio no grupo de mulheres com SOP e em equilíbrio no grupo controle. O EHW é um dos fundamentos mais importantes da Genética de Populações, sendo um modelo com pressupostos para avaliar *pool* gênico de uma determinada população. Há alguns eventos, como os sistemas de acasalamento, tamanho da população e fatores evolutivos que podem atuar sobre as frequências gênicas nas populações (GRIFFITHS et al, 2013; WAPLES, 2014). Os desvios do EHW também podem ser indicativo de falhas, como erro de genotipagem, estratificação populacional e viés de seleção (SALANTI et al, 2005). Quando testado o EHW e encontrado o desequilíbrio entre casos e controles pode ser decorrente da seleção aleatória dos indivíduos estudados, modelo de doença adotada e/ou mudanças aleatórias nas frequências genóticas em decorrência de erros de amostragem (deriva genética). Quando não há equilíbrio entre os casos, pode estar relacionado com a doença (com apresentação de diferença estatística na frequência genotípica) ou processo de eliminação do alelo deletério pela ação da seleção natural (sem diferença estatística na frequência genotípica). E quando os indivíduos controles estão em desequilíbrio de HW, pode significar que há um efeito protetor (XU et al, 2002; LLORCA et al 2005; WITTKE-THOMPSON et al, 2005).

Na análise multivariada, o histórico familiar de SOP se apresentou mais frequente entre as mulheres com a síndrome, nesse estudo, demonstrando que os componentes hereditários podem estar implicados com a etiologia da SOP, e esse resultado se encontra de acordo com alguns estudos. Vink e colaboradores (2006), realizaram um estudo com gêmeos na população holandesa, e esses autores evidenciaram que a síndrome possui uma base hereditária, e que fatores genéticos estão fortemente relacionados com o desenvolvimento da síndrome, e essas

informações se tornam base importante na justificativa de estudos de genes suscetíveis à SOP. Ewens e colaboradores (2010) estudaram genes suscetíveis ao desenvolvimento de SOP em 502 famílias que tinham filhas e irmãs com SOP e concluíram que alguns genes estão relacionados com risco da síndrome.

Neste estudo, houve diferença significativa entre os grupos para o hábito tabagista, com maior frequência no grupo controle. Esse estudo não observou associação do hábito de fumar como fator de risco para a síndrome, diferente de outros estudos que avaliaram o efeito do fumo nas mulheres com SOP, e apresentaram que mulheres com a doença e fumantes têm risco aumentado para disfunções endocrinológicas ou desenvolver doenças associadas à síndrome (CUPISTI et al, 2010; PAU et al, 2013; MOROTTI et al, 2014; XIROFOTOS et al, 2015).

Considerando que as mulheres com SOP podem apresentar níveis aumentados de Hcy, com possível consequência para hiperhomocisteinemia (de la CALLE et al 2007; CERQUEIRA et al, 2010; LIN et al, 2013) e também outros distúrbios metabólicos, a suplementação de ácido fólico pode ser um fator benéfico para a uma vida mais saudável das mulheres com a síndrome, principalmente se essas mulheres estiverem com alterações do metabolismo do folato associado às deficiências enzimáticas e polimorfismos genéticos participantes dessa via. Alguns estudos apresentaram resultados relevantes na suplementação de ácido fólico em mulheres com SOP, demonstrando que a ingestão de 1 e/ou 5 mg/dia dessa vitamina diminuíram os níveis séricos de fatores inflamatórios, perfil metabólico e biomarcadores de estresse oxidativos, assim colaborando na melhoria dos aspectos bioquímicos da síndrome (KAZEROONI et al, 2008; ASEMI et al, 2014; BAHMANI et al, 2014).

Como limitação deste estudo, não foram coletados os níveis de Hcy das participantes do grupo estudado, os dados referentes a suplementação alimentar não foram coletados e também não foi possível a análise da associação dos fatores bioquímicos e polimorfismos analisados devido a coleta dos dados laboratoriais ter sido feita por meio dos prontuários médicos.

Os polimorfismos analisados, assim com o estudo de haplótipo deste trabalho, podem colaborar no entendimento de como os fatores genéticos podem influenciar no desenvolvimento e/ou manifestações fenotípicas da SOP. Estes SNPs e a

abordagem por haplótipos ainda podem ser grande fonte de estudo para a avaliação de possíveis biomarcadores para a doença.

Os resultados desse trabalho podem fornecer dados relevantes para futuros estudos com esse tipo de abordagem e ainda colaborar para o entendimento entre o metabolismo do folato e a Síndrome dos Ovários Policísticos.

Conclusão

3 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, conclui-se que:

- A frequência genotípica do polimorfismo A80G no gene *RFC-1* mostra diferença significativa entre as mulheres com SOP e controles. Os homocigotos polimórficos do SNP *MTRR* A66G e os heterocigotos para o polimorfismo A80G no gene *RFC-1* se apresentam com maior frequência no grupo controle e podem estar associados aos fatores de proteção para a síndrome.
- O haplótipo T-C dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* também está mais frequente no grupo controle, que pode estar associado com fator protetor para a síndrome nessa casuística;
- Dentre os fatores de risco para a síndrome, o histórico de SOP familiar está associado com a doença, sendo mais frequente no grupo de mulheres com SOP.

Referências
Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABU-HIJLEH, T.M. et al. Common variants in the Sex hormone-binding globulin (SHBG) gene influence SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. **Ann Nutr Metab**, v. 68, p. 66-74, 2016.
- ANANTH, C. V. et al. Reduced folate carrier 80A→G polymorphism, plasma folate, and risk of placental abruption. **Hum Genet**, v. 124, n. 2, p. 137-145, set. 2008.
- ARANTES, L.M.R.B. et al. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 50, p. 587 – 592, 2014.
- ASEMI, Z.; KARAMALI, M.; ESMAILZADEH, A. Metabolic response to folate supplementation in overweight women with polycystic ovary syndrome: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 7, p. 1-9, 2014.
- ASIMI, Z. V. et al. Incidence of prediabetes and risk of developing cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome. **Bosn J Basic Med Sci**, v. 16, n. 4, p. 298-306, jun. 2016.
- AZZIZ, R. et al. Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews/Disease Primers**, v. 2, p. 1-18, ago. 2016.
- BADAWY, A. et al. Plasma homocysteine and polycystic ovary syndrome: The missed link. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 131, p. 68-72, 2007.
- BAGOS, P.G. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in polycystic ovary syndrome. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 19-26, 2009.
- BAHMANI, F. et al. The effects of folate supplementation on inflammatory factors and biomarkers of oxidative stress in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Clinical Endocrinology**, v. 81, n. 4, p. 582-587, out. 2014.
- BARBER, T.M. et al. Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance. **Clinical Medicine**, v. 16, n. 3, p. 362-366, 2016.
- BARRY, J. A.; AZIZIA, M.M.; HARDIMAN, P.J. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 5, p. 748–758, mar. 2014.
- BARTHELMESS, E.K.; NAZ, R.K. Polycystic ovary syndrome: current status and future perspective. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 6, p. 104-119, 2014.

BERKER, B. et al. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2293-2302, 2009.

BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 1, p.75-81, 2011.

BOZDAG, G. et al. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, p. 1-15, ago. 2016.

CARLUS, S.J. et al. Is MTHFR 677 C>T polymorphism clinically important in polycystic ovarian syndrome (PCOS)? A case-control study, meta-analysis and trial sequential analysis. **Plos One**, v. 11, n. 3, mar. 2016.

CASTRO, R. et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. **Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 96,n. 4, p. 297- 303, 2003.

CERQUEIRA, J.M.C. et al. Homocisteinemia em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 32, n. 3 p.126-32, 2010.

CHANGO, A. et al. A polymorphism (80G→A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 70, n. 4, p. 310-315, 2000.

CHEN, X. et al. Adipokines in reproductive function: a link between obesity and polycystic ovary syndrome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 50, n. 2, p. R21-R37, 2013.

CHOI, S.W. et al. Association between a single nucleotide polymorphism in MTHFR gene and polycystic ovary syndrome. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 145, p. 85-88, 2009.

CONWAY, G. et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. **European Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 4, p. P1-P29, 2014.

COPPEDÈ, F. et al. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140A, n. 10, p. 1083-1091, maio 2006.

COPPEDÈ, F. et al. Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. **American Journal of Medical Genetics**, v. 143A, n. 17, p. 2006-2015, set. 2007.

CUPISTI, S. et al. Smoking is associated with increased free testosterone and fasting insulin levels in women with polycystic ovary syndrome, resulting in aggravated insulin resistance. **Fertility and Sterility**,v. 94, n. 2, p. 673- 677, Jul. 2010.

De ALVARENGA, M.P.S.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; GOLONI-BERTOLLO, E.M. Comparing techniques for the identification of the MTHFR A1298C polymorphism. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 19, p. 103–105, 2008.

De ÁVILA, M.A.P. et al. Síndrome dos ovários policísticos: implicações da disfunção metabólica. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 41, n. 2, p. 106 -111, 2014.

De la CALLE, M. et al. Concentraciones elevadas de homocisteína en el síndrome de ovario poliquístico. **Med Clin (Barc)**, v. 129, n. 8, p. 292-294, 2007.

De LEO, V. et al. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n. 38, p. 1-17, 2016.

DESAI, A.; SEQUEIRA, J.M.; QUADROS, E.V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. **Biochimie**, v. 126, p. 31-42, 2016.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Polycystic Ovary Syndrome: The influence of environmental and genetic factors. **Hormones**, v. 5, n. 1, p. 17-34, 2006.

DIX, A. et al. Use of systems biology to decipher host-pathogen interaction networks and predict biomarkers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 600-606, 2016.

DUMESIC, D.A.; LOBO, R.A. Cancer risk and PCOS. **Steroids**, v. 78, p. 782–785, abr. 2013.

DUMESIC, D.A. et al. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 487- 525, out. 2015.

ECONOMOU, F. The pluripotential effects of hypolipidemic treatment for polycystic ovary syndrome (PCOS): dyslipidemia, cardiovascular risk factors and beyond. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 908-921, 2011.

EWENS, K.G. et al. Family-based analysis of candidate genes for polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 5, p. 2306-2315, maio. 2010.

FAN, S.J. et al. Are MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms associated with overweight/obesity risk? From a case-control to a meta-analysis of 30,327 subjects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 11849-11863, 2015.

FERREIRA, A.L.A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 1, p. 54-61, jan-fev. 2011.

FOX, J.T.; STOVER, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism. **Vitamins and Hormones**, v. 79, cap. 1, p. 1-44, 2008.

FOWLER, B. The folate cycle and disease in humans. **Kidney International**, v. 59, n. 78, p. S221-S229, 2001.

FU, L. et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with polycystic ovary syndrome risk: a systematic review and meta-analysis update. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 172, p. 56-61, 2014.

GABRIELLI, L.; AQUINO, E.M.L. Polycystic ovary syndrome in Salvador, Brazil: a prevalence study in primary healthcare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 96, p. 1-10, nov. 2012.

GALBIATTI, A.L.S. et al. Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 1, p. 132-139, jan./ fev. 2012.

GAUGHAN, D. J. et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G Polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis**, v. 157, n. 2, p. 451-456, 2001.

GLUECK, C.J. et al. Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. **Metabolism**, v. 48, n. 12, p. 1589-1595, dez.1999.

GOTTSCHAU, M. et al. Risk of cancer among women with polycystic ovary syndrome: A Danish cohort study. **Gynecologic Oncology**, v. 136, p. 99 - 103, nov. 2015.

GOYETTE, P. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nat Genet.**, v. 7, n. 4, p. 195-200, Ago.1994.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. Genética de Populações.10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556-582 p.

GUZELMERIC, K. et al. Chronic inflammation and elevated homocysteine levels are associated with increased body mass index in women with polycystic ovary syndrome. **Gynecological Endocrinology**, v. 23, n. 9, p. 505-510, set. 2007.

HUANG, G.; COVIELLO, A. Clinical update on screening, diagnosis and management of metabolic disorders and cardiovascular risk factors associated with polycystic ovary syndrome. **Current Opinion Endocrinology Diabetes Obesity**, v. 9, n. 6, p. 512-519, dez. 2012.

HUANG, X. et al. The association between RFC1 G80A polymorphism and cancer susceptibility: Evidence from 33 studies. **Journal of Cancer**, v. 7, p. 144-152, 2016.

IDALI, F. et al. Plasminogen activator inhibitor 1 and methylenetetrahydrofolate reductase gene mutations in iranian women with polycystic ovary syndrome. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 68, p. 400-407, 2012.

- ILIE, I.R.; GEORGESCU, C.E. Polycystic ovary syndrome - epigenetic mechanisms and aberrant MicroRNA. **Adv Clin Chem.**, v. 71, p. 25-45, jun. 2015.
- INSENER, M. et al. Proteomic and metabolomic approaches to the study of polycystic ovary syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 370, n. 1-2, p. 65-77, maio 2013.
- JAIN, M. et al. MTHFR C677T polymorphism is associated with hyperlipidemia in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Human Reproductive Sciences** v. 5, n. 1, p. 52-56, jan./abr. 2012.
- JIANG, S. et al. Associations of MTHFR and MTRR polymorphisms with serum lipid levels in chinese hypertensive patients. **Clinical and Applied Thrombosis / Hemostasis**, v. 20, n. 4, p.400-410, 2014.
- JONES, M.R.; GOODARZI, M.O. Genetic determinants of polycystic ovary syndrome: progress and future directions. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 1, p. 25-32, jul. 2016.
- KANDI, V.; VADAKEDATH, S. Effect of DNA Methylation in Various Diseases and the Probable Protective Role of Nutrition: A Mini-Review. **Cureus**, v. 7, n. 8, p. 1-6, ago. 2015. e-309.
- KAO, Y.H. et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in polycystic ovary syndrome: implications for the genesis of cardiovascular diseases. **Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility**, v. 6, n. 4, p. 208-213, jan/mar. 2013.
- KARADENIZ, M. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism in turkish patients with polycystic ovary syndrome. **Endocrine**, v. 38, p. 127-133, 2010.
- KAZEROONI, T. et al. Effect of folic acid in women with and without insulin resistance who have hyperhomocysteinemic polycystic ovary syndrome. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 101, p.156-160, 2008.
- KIM, J.W. et al. Association between folate metabolism-related polymorphisms and colorectal cancer risk. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 639-648, 2015.
- KOSOVA, G.; URBANEK, M. Genetics of the polycystic ovary syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 373, p. 29-38, 2013.
- LAKSHMI, S.V. et al. Interactions of 5'-UTR Thymidylate synthase polymorphism with 677C→T Methylene tetrahydrofolate redustase and 66A→G Methytetrahydrofolate homocysteine methyl-transferase reductase polymorphisms determine susceptibility to coronary disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 2011.
- LARAQUI, A. et al. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine and relation to risk of coronary artery disease. **Acta Cardiology**, v. 61, n. 1, p. 51-61, 2006.

LECLERC, D. et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 12, p. 1867-1874, 1996.

LECLERC, D. et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3059-3064, mar.1998.

LEE, Y.H.; SONG, G.G. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and the MTHFR 677C/T polymorphisms and susceptibility to polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 175, p. 8-14, 2014.

LEGRO, R.S. Obesity and PCOS: Implications for Diagnosis and Treatment. **Semin Reprod Med**, v. 30, n. 6, p. 496-506, dez. 2012.

LI, Y. N. et al. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 12, p. 1851-1858, 1996.

LI LUO, M.S. et al. Polymorphisms of genes involved in the folate metabolic pathway impact the occurrence of unexplained recurrent pregnancy loss. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 7, p. 845-851, 2015.

LI, W. X. et al. Joint associations of folate, homocysteine and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms with dyslipidemia in a Chinese hypertensive population: a cross-sectional study. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 101, 2015.

LI, X.; SHAO, R. PCOS and obesity: insulin resistance might be a common etiology for the development of type I endometrial carcinoma. **Am J Cancer Res**, v. 4, n. 1, p. 73-79, jan. 2014.

LI, Z.; HUANG H. Epigenetic abnormality: A possible mechanism underlying the fetal origin of polycystic ovary syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 3, p. 638- 642, 2008.

LIM, A.J.R. et al. Sleep duration, exercise, shift work and polycystic ovarian syndrome-related outcomes in a healthy population: a cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, nov. 2016. e0167048.

LIM, S.S. et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 6, p. 618–637, 2012.

LIN, Y.H. et al. Hyperhomocysteinaemia is associated with biochemical hyperandrogenaemia in women with reproductive age. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 171, n.2, p. 314-318, dez. 2013.

LLOROCA, J. et al. Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association. **Gac Sanit.**, v. 19, n. 4, p. 321-324, jul/ago. 2005.

MANI, H. et al. Diabetes and cardiovascular events in women with polycystic ovary syndrome: a 20-year retrospective cohort study. **Clinical Endocrinology**, v. 78, p. 926-934, 2013.

MARCONDES, J.A.M.; BARCELLOS, C.R.G.; ROCHA, M.P. Dificuldades e armadilhas no diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 1, fev. 2011.

MATSUO, K. et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3205-3209, maio. 2001.

MERKIN, S.S. et al. Environmental determinants of polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 1, p. 16-24, jul. 2016.

MIYAKI, K. Genetic polymorphisms in homocysteine metabolism and response to folate intake: a comprehensive strategy to elucidate useful genetic information. **Journal Epidemiology**, v. 20, n. 4, p. 266-270, 2010.

MORAN, L.J. et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, p. 347-363, 2010.

MORGAN, C.L. et al. Evaluation of adverse outcome in young women with polycystic ovary syndrome versus matched, reference controls: a retrospective, observational study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 9, p. 3251-3260, set. 2012.

MOROTTI, E. et al. Cigarette smoking and cardiovascular risk in young women with polycystic ovary syndrome. **Int J Fertil Steril.**, v.7, n. 4, p. 301-312, 2014.

MORRIS, R.W.; KAPLAN, N.L. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. **Genetic Epidemiology**, v. 23, p. 221 – 233, 2002.

MOURA, H.H.G. et al. Síndrome do ovário policístico: abordagem dermatológica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 111-119, 2011.

NANDI, A. et al. Polycystic ovary syndrome. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v. 43, p.123-147, 2014.

NAZKI, F.H.; SAMEER, A.S.; GANAIE, B.A. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. **Gene**, v. 533, p.11-20, 2014.

NIEDZIELSKA, E. et al. The influence of genetic RFC1, MS and MTRR polymorphisms on the risk of acute lymphoblastic leukemia relapse in children and the adverse effects of methotrexate. **Adv Clin Exp Med**, v. 22, n. 4, p.579-584, 2013.

NGUYEN, T.T, et al. Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. **Gastroenterology**, v. 112, n. 3, p. 783 – 791, 1997.

NORMAN, R. J. et al. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.13, n.6, p.251-257, ago. 2002.

ORIO, F. et al. Homocysteine levels and C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase in women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p.673-679, fev. 2003.

ORIO, F. et al. Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: an uptodate in the management of polycystic ovary syndrome. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 207, p. 214 – 219, dez. 2016.

OZEGOWSKA, K. et al. Is there an association between the development of metabolic syndrome in PCOS patients and the C677T MTHFR gene polymorphism? **Ginekologia Polska**, v. 87, n. 4, p. 246-253, 2016.

PALEP-SINGH, M. et al. Polycystic ovary syndrome and the single nucleotide polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase: a pilot observational study. **Human Fertility**, v. 10, n. 1, p. 33-41, mar. 2007.

PALEP-SINGH, M. et al. Plasma homocysteine concentrations and the single nucleotide polymorphisms in the methionine synthase gene (MTR 2756A>G): Associations with the polycystic ovary syndrome. An observational study. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 138, p. 180-186, 2008.

PALOMBA, S. et al. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 5, p. 575–592, 2015.

PASQUALI, R.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; GAMBINERI, A. Secondary polycystic ovary syndrome: theoretical and practical aspects. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 4, p. R157-R169, 2016.

PAU, C.T.; KEFFE, C.C.; WELT, C.K. Cigarette smoking, nicotine levels and increased risk for metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 551-555, jun. 2013.

PENA, S.D.J. et al. Retrato Molecular do Brasil. **Ciência Hoje**, v. 27, n.159, p. 16-25, abr. 2000.

PETRAS, M. et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 15-23, 2014.

PRUKSANANONDA, K. et al. Epigenetic modification of long interspersed elements-1 in cumulus cells of mature and immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. **Clin Exp Reprod Med**, v. 43 n. 2, p. 82-89, 2016.

QI, Q. et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 32, n. 3, p. 400-404, jun. 2015.

RAINA, J.K. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G gene polymorphisms and associated risk of cardiovascular diseases: A study from Jammu region. **Indian Heart J.**, v. 68, n. 3, p. 421-430, maio/jun. 2016.

RATHER, R.A.; DHAWAN, V. Genetic markers: Potential candidates for cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**, v. 220, p. 914-923, 2016.

ROCHA, A.P. et al. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

ROH, E.Y. et al. Single nucleotide polymorphisms in the TGF- β 1 gene are associated with polycystic ovary syndrome susceptibility and characteristics: a study in Korean women. **J Assist Reprod Genet.**, out. 2016.

Rotterdam ESHRE/ASRM. Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, v. 19, n. 1, p. 41-47, 2004.

ROZYCKA, A. et al. Homocysteine level and mechanisms of injury in Parkinson's disease as related to MTHFR, MTR, and MTHFD1 genes polymorphisms and Ldopa treatment. **Current Genomics**, v. 14, p. 534-542, 2013.

SAAD, M.N. et al. Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Advanced Research**, v. 7, p. 1-16, 2016.

SALANTI, G. et al. Hardy–Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, p. 840-848, 2005.

SALEHPOUR, S. et al. Evaluation of homocysteine levels in patients with polycystic ovarian syndrome. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 4, n. 4, p. 168-171, jan./mar. 2011.

SALEM, A.B. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGFA) gene variation in polycystic ovary syndrome in a Tunisian women population. **BMC Genomics**, v. 17, p. 72- 87, 2016 (Suppl 9).

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: A laboratory manual in: cold spring harbor laboratory press**. 2ed, New York: Editora Cold Spring Harbor, 1989.

SCAZZONE, C. et al. Methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is not related to plasma homocysteine concentration and the risk for vascular disease. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 2, p.131-133, abr. 2009.

SEN, T.A. et al. Homocysteine and ghrelin link with polycystic ovary syndrome in relation to obesity. **Journal Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 24, p. 211-217, 2011.

SHAIKH, N. et al. Polymorphisms and haplotypes of *insulin-like factor 3* gene are associated with risk of polycystic ovary syndrome in Indian women. **Gene**, 2015.

SHIM, U. et al. Pathway analysis based on a genome-wide association study of polycystic ovary syndrome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-11, ago. 2015. e0136609.

SIBANI, S. et al. The silent T1317C mutation of methylenetetrahydrofolate reductase should not interfere with *MbolI* restriction isotyping of the reported A1298C mutation. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 68, p. 512, 1999.

SILLS, E.S. et al. Plasma homocysteine, fasting insulin, and androgen patterns among women with polycystic ovaries and infertility. **J Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 27, n. 3 p. 163-168, 2001.

SINGH, P.R. LELE, S.S. Folate gene polymorphisms MTR A2756G, MTRR A66G, and BHMT G742A and risk for coronary artery disease: a meta-analysis. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 471-475, 2012.

SIRMANS, S.M., PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 1-13, 2014.

SOUSA, R.M.L. et al. Marcadores de obesidade e risco cardiovascular em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Rev Bras Cardiol.**, v. 26, n. 2, p. 131-137, mar/abr. 2013.

STEVENS, V. L. et al. Association of polymorphisms in one-carbon metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 16, n. 6, Jun. 2007.

SUKLA, K.K.; RAMAN, R. Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 111–118, 2012.

SZAFAROWSKA, M.; SEGIET, A.; JERZAK, M.M. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C and C677T polymorphisms and adverse pregnancy outcome in women with PCOS. **Neuroendocrinology Letters**, v. 37, n. 2, p. 141-146, 2016.

TANAKA, S.C.S.V. et al. Polimorfismos no gene *VEGF* para o desenvolvimento das síndromes hipertensivas gestacionais: revisão de literatura. **Rev Enferm Atenção Saúde**, v. 3, n. 2, p. 86-96, jul/dez 2014.

TERRUZZI, I. et al. Are genetic variants of the methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity? **J. Endocrinol. Invest.** v. 30, n. 9, p.747-753, out. 2007.

TRIKUDANATHAN, S. Polycystic ovarian syndrome. **Med Clin N Am**, v.99, p.221-235, 2015.

TSANADIS, G. et al. Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia. **Human Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 314-319, 2002.

VAGI, S.J. et al. Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol A in polycystic ovary syndrome: a case-control study. **BMC Endocr Disord**, v.14, n.86, p.1-12, 2014.

VAN der PUT, N.M.J. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet.**, v. 62, n. 5, p. 1044-1051, maio 1998.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: ácido fólico. **ILSI Brasil-Internacional Life Sciences Institute do Brasil**, São Paulo, v. 10, 2010.

VENKATESH, T. et al. New insights into the genetic basis of infertility. **The Application of Clinical Genetics**, v. 7, p. 235- 243, 2014.

VINK, J.M. et al. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 6, p. 2100-2104, jun. 2006.

WAPLES, R.S. Testing for Hardy-Weinberg proportions: Have we lost the plot? **Journal of Heredity**, v.106, n. 1, p.1-19, 2015.

WEISBERG, I. et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 64, p. 169-172, 1998.

WILSON, A. et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (Vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 67, n. 4, p. 317–323, 1999.

WITTKÉ-THOMPSON, J. K.; PLUZHNIKOV, A.; COX, N.J. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. **Am J Hum Genet.**, v.76, n. 6, p. 967-986, abr. 2005.

WU, J.B.; ZHAI, J.F.; YANG, J. Role of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in polycystic ovary syndrome risk. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 4, p.1-8, 2016.

XIROFOTOS, D. et al. The amount and duration of smoking is associated with aggravation of hormone and biochemical profile in women with PCOS. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 2, p. 143-146, 2015.

XU, J. et al. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? **Hum Genet.**, v.111, n. 6, p. 573-574, dez. 2002.

XU, N. et al. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in prenatally androgenized rhesus monkeys. **PLoS ONE**, v. 6, n.11, p. e27286, 2011.

YAMADA, K. et al. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 25, p. 9476-9481, 2006.

YANG, B. et al. Associations of MTHFR C677T and MTRR A66G gene polymorphisms with Metabolic Syndrome: A case-control study in Northern China. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 12, p. 21687-21702, nov. 2014.

YANG-FENG, T.L. et al. Assignment of the human folate gene to chromosome 21q22.3 by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 210, n. 3, p. 874-879, maio 1995.

YANG, J. et al. Polymorphisms and haplotypes of the TGF- β 1 gene are associated with risk of polycystic ovary syndrome in Chinese Han women. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v.186, p. 1–72, 2015.

YANG, Q. et al. Association of serum levels of typical organic pollutants with polycystic ovary syndrome (PCOS): a case-control study. **Hum Rep**, v. 30, n. 8, p.1964-1973, 2015.

YARAK, S. et al. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica a insulina. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 395-410, 2005.

YU, Y.Y. et al. Genome-wide screen of ovary-specific DNA methylation in polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 104, n.1, p-145-153, jul. 2015.

ZHAO, H. et al. Genetic studies on polycystic ovary syndrome. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 37, p. 56-65, nov. 2016.

ZHI, X. et al. Gender-specific interactions of MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms with overweight/obesity on serum lipid levels in a Chinese Han population. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n.1, p.185, out. 2016.

ZHU, L. Polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and their correlation with unexplained recurrent spontaneous abortion susceptibility. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8500-8508, jul. 2015.

Apêndices
e Anexos

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Livre e esclarecido para Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Em virtude de você ter uma doença denominada síndrome dos Ovários Policísticos e está sendo convidada a participar do grupo de pacientes para um estudo intitulado “Polimorfismos genéticos em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”. A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma doença ginecológica comum que afeta mulheres em idade reprodutiva e é caracterizada por irregularidades menstruais e presença de cistos nos ovários. Variantes genéticas podem estar associados ao desenvolvimento desta doença. Deste modo, avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é investigar polimorfismos genéticos em mulheres com síndrome dos ovários policísticos e sem a doença (grupo controle). Caso você participe, será necessário ceder uma amostra de sangue. A colheita de sangue é um procedimento comum e será realizada por um profissional habilitado utilizando seringa descartável. Você poderá ter algum desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu braço.

Você poderá obter informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Eu, _____ li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.
Uberaba,/...../.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade e/ou CPF

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

No caso de dúvidas, entre em contato com um dos pesquisadores integrantes da pesquisa:

Profa. Dra. Mariângela Torreglosa Ruiz – (34) 3333-5751

Profa. Dra. Alessandra Bernadete Trovó de Marqui - (34) 3700-6434

Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin – (34) 3700-6434

Profa. Ms. Roseane Lopes da Silva Grecco - (34) 3700-6434

Prof. Dr. Marco Fábio Prata Lima

Profa. Dra. Mariana Kefalas Oliveira Gomes

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Livre e Esclarecido para Controles



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Estamos realizando um estudo denominado “Polimorfismos genéticos em mulheres com síndrome dos ovários policísticos”. Em virtude do seu resultado negativo, por meio do exame clínico para síndrome dos ovários policísticos, você está sendo convidada a participar do grupo controle, necessário para toda pesquisa científica. A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma doença ginecológica comum que afeta mulheres em idade reprodutiva e é caracterizada por irregularidades menstruais e presença de cistos nos ovários. Variantes genéticas podem estar associados ao desenvolvimento desta doença. Deste modo, avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é investigar polimorfismos genéticos em mulheres com síndrome dos ovários policísticos e sem a doença (grupo controle). Caso você participe, será necessário ceder uma amostra de sangue. A colheita de sangue é um procedimento comum e será realizada por um profissional habilitado utilizando seringa descartável. Você poderá ter algum desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu braço. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento.

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Eu, _____ li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.
Uberaba,/...../.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade e/ou CPF

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Contato com um dos pesquisadores integrantes da pesquisa:

Profa. Dra. Mariângela Torreglosa Ruiz – (34) 3333-5751
Profa. Dra. Alessandra Bernadete Trovó de Marqui - (34) 3700-6434
Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin – (34) 3700-6434
Profa. Ms. Roseane Lopes da Silva Grecco - (34) 3700-6434
Prof. Dr. Marco Fábio Prata Lima Profa.
Dra. Mariana Kefalas Oliveira Gomes

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS SÓCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E EXAMES BIOQUÍMICOS E HORMONAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO- UBERABA-MG

Departamento de Ciências Biológicas
Rua Getúlio Guaritá, 159 – Fone: (34)3318-5909- Uberaba/MG

**“POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS”**

Pesquisadora responsável:

Profa. Dra. Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra

Pesquisadores integrantes da equipe:

Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Profa. Ms. Roseane Lopes da Silva Grecco

Profa. Dra. Alessandra Bernadete Trovó de Marqui

Prof. Dr. Marco Fábio Prata Lima

Profa. Dra. Mariana Kefalas Oliveira Gomes

Profa. Dra. Elisabete Aparecida Mantovani R. de Rezende

**DADOS SÓCIO DEMOGRÁFICO, CLÍNICO E EXAMES
BIOQUÍMICOS E HORMONAIS**

NOME COMPLETO: _____

RG HC/UFTM: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ **IDADE:** _____

ESTADO CIVIL: _____

PROFISSÃO: _____

TELEFONE PARA CONTATO: _____

ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____

PARIDADE: GESTA ___ PARA ___ (N ___ C ___ F___) A ___ (E___ P___)

PADRÃO MENSTRUAL:

Intervalo: _____ Duração: _____ Volume: _____

- Eumenorréia
- Poli/Proimenorréia
- Opso/Espaniomenorréia
- Amenorréia
- Hipo/Oligomenorréia
- Metrorragia
- Hipermenorragia

SPOTTING PRÉ-MENSTRUAL? Sim Não

SPOTTING PÓS-MENSTRUAL? Sim Não

TEMPO DE INFERTILIDADE (ANOS): _____

ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE INFERTILIDADE?

Não Sim Qual(is)? _____

HISTÓRICO DE SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO FAMILIAR?

Não Sim Parentesco: _____

TABAGISTA? Sim Não _____ Cigarros/Dia

ETILISMO? Sim Não _____ Copos/Semana

CO-MORBIDADES? Não Sim Qual(is)? _____

1) Eclâmpsia: sim não

2) Pré-eclâmpsia: sim não

3) Hipertensão: sim não

4) Diabetes mellitus (tipo 1, 2 ou diabetes gestacional): sim não

5) Artrite reumatoide: sim não

6) Arterite de células gigantes: sim não

7) Retinopatia diabética: sim não

8) Psoríase ou doença de Behçet: sim não

9) Lupus eritematoso sistêmico: sim não

10) Esclerose múltipla: sim não

11) Carcinoma oral de células escamosas: sim não

12) Cirrose biliar primária: sim não

13) Urolitíase: sim não

14) Leiomioma: sim não

15) Câncer de ovário: sim não

16) Câncer de endométrio: sim não

DOENÇAS CARDIOVASCULARES: () Não () Sim Qual(is)? _____

MEDICAÇÃO EM USO: _____

EM USO DE MEDICAÇÃO HORMONAL? () Não () Sim Qual: _____

HIPERANDROGENISMO:

Exame Clínico: () Sim () Não

() HIRSUTISMO – FERRIMAN _____

() ACNE

() OLEOSIDADE PELE E CABELO

() QUEDA DE CABELO

PESO: _____ **ALTURA:** _____ **IMC:** _____

CINTURA: _____ **PRESSÃO ARTERIAL:** _____

ACANTOSE NIGRICANS: () SIM () NÃO

EXAMES BIOQUÍMICOS E HORMONAIS:

FSH: _____ LH: _____ TSH: _____ T4L: _____ PROLACTINA: _____

TESTOSTERONA: _____ 17-OHP: _____ S-DHEA: _____

CORTISOL: _____ GLICEMIA JEJUM (GLICOSE): _____

GPP: _____

COLESTEROL TOTAL: _____ HDL: _____ LDL: _____ VLDL: _____

TRIGLICERÍDEOS: _____ TGO: _____ TGP: _____ INS.: _____

UREIA: _____ CREATININA: _____ ÁC.ÚRICO: _____

PROGESTERONA: _____

OUTROS: _____

US TRANSVARGINAL: () NÃO () SIM

VOLUME UTERINO: _____

VOLUME ENDOMÉTRIO: _____

VOLUME OVÁRIO DIREITO: _____

Nº FOLÍCULOS: _____

VOLUME OVÁRIO ESQUERDO: _____

Nº FOLÍCULOS: _____

OUTROS DADOS: _____

DATA DA COLETA DE SANGUE: _____ / _____ / _____

AMOSTRA: () PACIENTE CONTROLE (ausência de sinais de SOP)

() PACIENTE CASO (presença de sinais de SOP)

ANEXO A – PARECER E EXTENSÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

1/4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTÓCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: POLIMORFISMOS DO GENE *VEGF* EM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Mariângela Torreglosa Ruiz
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 22/11/2010
PROTÓCOLO CEP/UFTM: 1796

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS

Este trabalho objetiva a análise dos polimorfismos -2578 A/C, -1154 G/A, -105 G/C e +936 C/T do gene *VEGF* em pacientes com síndrome do ovário policístico e em um grupo controle.

2. JUSTIFICATIVA

A síndrome do ovário policístico (SOP) representa a doença endócrina mais comum (15 a 20%) entre as mulheres em idade reprodutiva. É uma doença heterogênea caracterizada principalmente por: (a) hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico; (b) disfunção ovariana e/ou morfologia policística, e (c) distúrbios metabólicos associados em uma considerável proporção de mulheres.

Há vários dados que sugerem a etiologia genética desta síndrome, dentre eles, estudos de agregação familiar que mostram vários casos de desordens metabólicas na mesma família; fenótipo em homens caracterizadas por algumas alterações hormonais e estudos em gêmeos, que demonstram a interação dos fatores genéticos e ambientais. Alguns genes tem sido relacionado à SOP como os genes correlacionados com a biossíntese e produção de andrógenos, os genes relacionados à resistência a insulina e os genes que codificam citocinas inflamatórias

A síndrome do ovário policístico possui etiologia multifatorial e pouco é conhecido a respeito da origem genética desta síndrome. Atualmente há trabalhos na literatura que analisam polimorfismos para avaliar a suscetibilidade à síndrome, há uma grande escassez de trabalhos que analisam a população brasileira, e os polimorfismos a serem avaliados estão ainda relacionados à doenças cardiovasculares, que tem uma alta prevalência nesta síndrome.

3. ESCRITAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Será avaliado um total de 50 amostras de sangue periférico procedentes de pacientes com síndrome do ovário policístico.

O grupo controle será constituído por 50 pacientes sem história de hiperandrogenismo, disfunção menstrual, infertilidade ou sinal sonográfico de SOP.

As mulheres avaliadas nessa pesquisa serão atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetria da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) pelos médicos integrantes da equipe.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Inclusão: Serão incluídas neste estudo mulheres com idade superior a 18 anos e mulheres com idade inferior após consentimento do responsável, pacientes com síndrome do ovário policístico que preencham o critério de Rotterdam, que estabelece a síndrome na presença de dois dos três sinais seguintes: (1) oligo ou anovulação, (2) hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico, (3) morfologia policística do ovário (The Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004).

Exclusão: não serão avaliadas pacientes com síndrome de Cushing, deficiência de 21-hidroxilase, disfunção da tireóide, hiperprolactinemia, diabetes, tumores secretores de andrógenos, e o uso atual ou no período de 6 meses de anticoncepcionais orais, anti-andrógenos, estatinas, glucocorticóides ou medicações para infertilidade.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
 Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: POLIMORFISMOS DO GENE *VEGF* EM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Marângela Torreglosa Ruiz
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 22/11/2010
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1796

5. ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

Análise Molecular

Extração do DNA genômico

O DNA genômico será obtido por meio da técnica segundo Miller et al. (1988), a partir de 5 ml. de sangue periférico.

b. Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Os polimorfismos +405 G/C, -2578 A/C e +936 C/T serão investigados por reação em cadeia da polimerase polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) com cada marcador será realizada em um volume total de 10 µl, utilizando-se 50 ng de DNA genômico, 0,3 µM de primer sense, 0,3 µM de primer antisense, 200 µM dNTP, 1X tampão de reação, 1,5mM MgCl₂, 0,2 unidades de Taq polimerase. A amplificação por PCR será realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50-60°C (dependendo das exigências de cada primer) e alongamento a 72°C por 30 segundos e etapa de extensão final a 72°C. Os produtos do PCR serão visualizados em gel de agarose 1,5%.

Os produtos de PCR serão submetidos à digestão enzimática, utilizando-se as enzimas adequadas. Os produtos de PCR e de restrição enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (Tris-LDTA-Borato), e identificados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo.

O Quadro 2 mostra a seqüências de primers e enzimas de restrição a serem utilizadas.

Quadro 2 - Primers e enzimas de restrição empregados no PCR-RFLP para detecção dos polimorfismos de posições +405, e -2578 do gene *VEGF*.

Polimorfismo	Seqüências dos primers (F: forward; R: reverse)	Enzimas de restrição
+405 G/C	F: 5' ATT TAT TTT TGC TGG CCA TT 3' R: 5' GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA 3'	<i>BsmFI</i>
-2578 A/C	F: 5' GGA TGG GGC TGA CTA GGT AAG C 3' R: 5' AGC CCC CTT TTC CTC CAA C 3'	<i>HgAI</i>
+936 C/T	F: 5' AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC 3' R: 5' TATGTGGGTTGGGTGTTCTACAGG 3'	<i>Nla III</i>

c. Discriminação alélica por PCR em tempo real

A investigação do polimorfismos *VEGF* -1154 G/A será realizada pela técnica de Discriminação Alélica por PCR em Tempo Real - SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). A reação será realizada em volume final de 5 µL contendo 5 ng de DNA genômico, 0,9 µM dos primers sense e anti-sense e 0,2 µM das sondas específicas para cada alelo investigado, marcadas com fluoróforos, e Master Mix 1X (concentração final). Primers e sondas TaqMan para detecção do polimorfismo *VEGF* -1154 G/A encontram-se disponíveis pelo fabricante (Assay ID - C_1647379-10). As reações serão realizadas em placas de 96 wells, no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System - Applied Biosystems no Laboratório Multusuário da UFTM. O software SDS versão 2.0 será utilizado para analisar a fluorescência emitida em tempo real ao final da reação de PCR (leitura endpoint).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: POLIMORFISMOS DO GENE *FZGF* EM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Mariângela Tomegosa Ruiz
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 22/11/2010
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1796

3. Análise Estatística

Para a análise estatística serão utilizados os programas computacionais Minitab/Windows - Versão 12.22, GraphPad InStat - versão 3.0, Bio Estat versão 3.0 e Stats Directs versão 16.17.

Os dados demográficos serão tabulados por estatística descritiva e comparados pelo teste Exato de Fisher. Este teste também será utilizado para as análises estatísticas da distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) será realizado pelo teste do qui-quadrado.

Os modelos de regressão logística múltipla serão utilizados para determinar o efeito das variáveis analisadas em síndrome do ovário policístico. Os modelos incluirão idade (referência: < mediana entre os dois grupos), e fatores de risco para a doença. Os resultados serão apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O nível de significância será estabelecido em 5% ($p=0.05$).

A análise de haplótipos é fundamental quando se investiga uma associação entre vários polimorfismos dentro de um gene. Análises baseadas em haplótipos podem auxiliar a diferenciar o efeito verdadeiro de um polimorfismo de um desequilíbrio de ligação por outras variantes, estes são estatisticamente supostos. Para tal análise será utilizado o programa Haploview. O coeficiente de desequilíbrio de ligação e o coeficiente de correlação (R^2) entre os SNPs também serão calculados pelo programa Haploview. O nível de significância será estabelecido em 5% ($p=0.05$).

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES

O presente projeto será realizado nos seguintes laboratórios: Citogenética Humana da Disciplina de Genética da UFTM, Multiusuários e Laboratório do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Deste modo, a UFTM disponibilizará como contrapartida a infraestrutura deste laboratório.

O Laboratório do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas se encontra em fase de implantação, visto que este curso é novo iniciado no ano de 2009. Atualmente o Laboratório consta com a infraestrutura básica para o preparo de soluções, há equipamentos como deionizador para água, estufa de secagem, banho-maria, capela para manipulação de ácidos, geladeira e vidrarias em geral. Há a necessidade da aquisição de novos equipamentos para viabilizar os projetos de pesquisa e assim proporcionar condições para que os graduandos em Ciências Biológicas possam complementar sua formação.

O Laboratório de Citogenética Humana da Disciplina de Genética da UFTM dispõe dos seguintes equipamentos que serão utilizados para execução desta proposta: centrífuga, centrífuga refrigerada, pHmetro, balança, banho-maria, freezer, freezer -70°C , capelas de fluxo laminar e de exaustão, geladeira, autoclave, estufa de secagem de vidraria, estufa para crescimento celular, sistema de purificação de água, máquina de PCR, sistema de fotodocumentação para géis, cubas de eletroforese horizontal e vertical, fonte e micropipetas. O Laboratório Multiusuário da UFTM dispõe de vários equipamentos dentre eles o 7500 Fast Real Time PCR System - Applied Biosystems que será utilizado neste projeto.

7. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

O único desconforto será no momento da coleta do material, por meio de agulha. O material (sangue) será identificado no laboratório por números e letras, a fim de preservar a privacidade e o anonimato da paciente, a preservação da identidade das pacientes também ocorrerá nas publicações científicas. A publicação dos resultados em revista científica será feita de modo que a paciente não seja identificada.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: POLIMORFISMOS DO GENE *TCGF* EM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Mariângela Torreglosa Ruiz
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 22/11/2010
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1796

8. RETORNO DE BENEFÍCIOS PARA O SUJEITO E/OU PARA A COMUNIDADE

Os benefícios incluem a possibilidade de utilizar marcadores moleculares no diagnóstico da síndrome do ovário policístico.

9. JUSTIFICATIVA DE SUSPENSÃO TERAPÊUTICA ("Wash out") – Não pertinente.

10. JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO – Não pertinente.

11. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA

Os laboratórios tem infraestrutura para o desenvolvimento do projeto de pesquisa, conforme detalhado no item J. No entanto, o projeto será submetido ao Edital Fapemig 15/2010 (Programa Primeiros Projetos - PPP) para aquisição de equipamentos e material de consumo a fim de incrementar a estrutura já existente.

Equipamentos: termociclador, cuba e fonte de eletroforese, pipetas, freezer – R\$ 12.500,00

material de consumo (*primers*, Taq polimerase, enzimas de restrição), plásticos, vidrarias, reagentes em geral – R\$ 7.500,00

Valor total R\$ 20.000,00

Em caso de não aprovação pela Fapemig, os custos de material de consumo serão custeados por outros projetos em andamento no laboratório. A infra-estrutura descrita no item J é suficiente para o desenvolvimento do projeto.

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

O pesquisador não terá remuneração além daquela referente ao cargo de professor adjunto da UFTM.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O Termo está adequado e será obtido pela equipe de pesquisadores em uma sala do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da UFTM.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo está adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 31/03/2011

Prof. Ana Palmira Soares dos Santos
 Coordenadora

1796

Pastas

Caixa de Entrada 482

Lixo

Rascunhos 39

Enviados

Excluídos

Resultados da Pesquisa

Nova pasta

Informamos que o Protocolo de Extensão 1796, de sua autoria, foi APROVADO em reunião do CEP.

Atenciosamente,
Eliana Cristina Rosa

Comitê de Ética em Pesquisa/CEP
cep@pesqg.uftm.edu.br
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM
(34) 3318-5854 - Avenida Frei Paulino, 30 - Abadia - CEP: 38025-180



ANEXO B - VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS RESULTADOS DE EXAMES BIOQUÍMICOS E HORMONAIS ESTABELECIDOS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO E VALORES DE REFERÊNCIA PARA CLASSIFICAÇÃO DO IMC:

FSH -F.F. :2,5 a 10,2 mUI/mL F.O.: 3,4 a 33,4 mUI/mL F.L.:1,5 a 9,1 mUI/mL	PCR - <0,5 mg/dL
LH - F.F.:1,9 a 12,5 mUI/mL F.O.: 8,7 a 76,3 mUI/mL F.L.:0,5 a 16,9 mUI/mL	ÁCIDO ÚRICO - < 5,7 mg/dL
FUNÇÃO LH/FSH INVERTIDA - < 2,5	TGO - Até 32 U/L
TSH - 0,270 a 4,200 mUI/mL	TGP - Até 33 U/L
T4 LIVRE - 0,9 a 1,7 ng/dL	UREIA - < 50 mg/dL
TESTOSTERONA TOTAL - 8,4 a 48,1 ng/dL	CREATININA - 0,4 a 1,4 mg/dL
17- α-HIDROXIPROGESTERONA – F.F.: 20 a 130 ng/dL F.L.: 100 a 450 ng/dL	PROLACTINA - 4,79 a 23,3 ng/mL
S-DHEA - 35 a 430 mg/dL	PROGESTERONA - F.F.:0,2 a 1,25 ng/dL; F.L.:1,1 a 27,0 ng/dL; F.O.:3,34 a 25,56 ng/dL
CORTISOL - 7h às 10h- 6,2 a 19,40 µg/dL 16h às 20h- 2,3 a 11,9 µg/dL	SÓDIO - 136 a 145 mmol/L
COLESTEROL TOTAL - <200 mg/dL	POTÁSSIO - 3,5 a 5,1 mmol/L
HDL - >40 mg/dL	CÁLCIO - 8,4 a 10,2 mg/dL (adulto de 12 a 60 anos)
LDL - até 159 mg/dL	MAGNÉSIO - 1,7 a 2,5 mg/dL
VLDL - <40 mg/dL	FÓSFORO - 2,7 a 4,5 mg/dL
Não HDL - <160 mg/dL	FERRITINA - 10 – 100 ng/mL
TRIGLICERÍDEOS - <150 mg/dL	ÁCIDO FÓLICO - 4,6 a 18,7 ng/mL
GLICOSE - 60 a 99 mg/dL	VITAMINA B12 - 211 – 946 pg/mL
GLICEMIA APÓS INGESTÃO - < 140 mg/dL	IMC – < 18,49 Kg/m ² – Baixo peso 18,50 a 24,99 Kg/m ² – Eutrófico (ideal) 25,00 a 29,99 Kg/m ² – Sobrepeso >30,00 Kg/m ² - Obesidade
GLICEMIA PÓS-PRANDIAL - < 145 mg/dL	
INSULINA BASAL - 1,9 a 23 mcUI/mL	Observações: F.F.: Fase Folicular; F.O.: Fase Ovulatória; F.L.: Fase Lútea.
INSULINA PÓS-PRANDIAL - <150 mcUI/mL	

