



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU***  
**INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS**

**MARIANA MENDES PORTO AZEVEDO**

**COMPOSIÇÃO CORPORAL E POLIMORFISMOS DE DELEÇÃO DOS**  
**GENES *GSTT1* E *GSTMI* EM SÍNDROME DOS OVÁRIOS**  
**POLICÍSTICOS**

**UBERABA/ MG**

**2019**

**Mariana Mendes Porto Azevedo**

**COMPOSIÇÃO CORPORAL E POLIMORFISMOS DE DELEÇÃO DOS GENES  
*GSTT1* E *GSTMI* EM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Interdisciplinar em Biociências Aplicadas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Mariangela Torreglosa Ruiz Cintra

UBERABA/ MG

2019

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

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

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

A988c Azevedo, Mariana Mendes Porto  
Composição corporal e polimorfismos de deleção dos genes GSTT1 e  
GSTM1 em síndrome dos ovários policísticos / Mariana Mendes Porto  
Azevedo. -- 2018.  
84 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018  
Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Torreglosa Ruiz Cintra

1. Ovário. 2. Síndrome do ovário policístico. 3. Polimorfismo genético. 4.  
Glutathione transferase. 5. Antropometria. I. Cintra, Mariangela Torreglosa  
Ruiz. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.621

MARIANA MENDES PÔRTO AZEVEDO

**COMPOSIÇÃO CORPORAL E POLIMORFISMOS DE DELEÇÃO DOS GENES  
GSTT1 E GSTM1 EM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

20 de agosto de 2018.

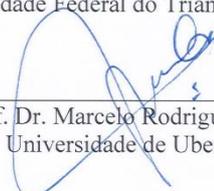
Banca Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariangela Torreglosa Ruiz Cintra - Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



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



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto  
Universidade de Uberaba

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais Leila e José Azevedo, aos meus irmãos, sobrinhos e demais familiares por todo apoio, vocês são o meu alicerce. Aos meus amigos, agradeço pelo companheirismo durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, pelas chances, pelas conquistas, pela força diária de levantar e agradecer cada suspiro.

À minha mãe, fonte de força e de amor mais pura e genuína, meu espelho, a pessoa que mais amo no universo, por não me deixar fraquejar e desistir.

À minha irmã, Lorena, agradeço por me motivar, me admirar e por eu ver seus olhos brilharem de orgulho pelas minhas conquistas. Nada me motiva mais que isso, e eu te amo demais!

Aos meus irmãos, Caliandra, Alessandra, José Ayres, Renato, Priscila, Pamela, Gabriel e Heloísa, agradeço a presença, mesmo que distante, e as boas vibrações.

Ao meu pai, pela admiração e amor, agradeço por toda força e por esse peito orgulhoso, que me motiva a ser sempre melhor.

Aos meus sobrinhos, sigo dizendo que são minha motivação diária para eu não desistir e ser, para eles, um exemplo.

À minha avó, por sempre me dar amor e incentivo.

Aos meus cunhados e cunhadas, meus tios e tias, primos e primas, família é tudo!

Aos meus amigos de faculdade, Luciana, Pedro, Carol, Ângelo, poxa...Obrigada por aguentarem as minhas lamúrias e por me apoiarem... obrigada por não desistirem de mim...

Às minhas amigas, Kamilla, Flávia, Raiane, Bruna, Barbara, Thaís, Maria Helena, Thaina, Belinha e Brandão, agradeço porque não me deixaram desistir, suportaram minhas inúmeras variações de humor, deram-me colo e aconchego em cada momento de desespero.

À Lara, Letícia, Arthur, Matheus, Isadora e Luiz Guilherme, semprejuntos de mim em todos os momentos da vida.

Á todos os meus amigos, em especial Arthur, Raul, Thales, Aline, Isabelle, Mário e Manoel por estarem sempre comigo.

Ao Matheus (Zé), pelos tantos ensinamentos e pela amizade que se criou diante disso. Se eu entrei no mestrado, você foi crucial!!

A toda a equipe, É pique, Claudia, Raquel, Evelin, que acompanharam bem de perto cada um dos meus perrengues, dando-me forças sempre!

À equipe do programa Melhor em Casa, não tenho nem palavras para agradecer.

Ao Rodrigo Franklin, obrigada pela disposição em me ajudar sempre que necessário.

Ao Rodrigo Rodrigues, grata pelo grande conhecimento compartilhado. Minha admiração e gratidão.

À Dani, por cada dúvida sanada e por toda parceria e disposição em me ajudar, sempre.

À Márcia, por me ouvir, pelo consolo e sempre me ajudar. Este mestrado teve um fruto chamado MALU. Amo muito você!

À Débora, Rose e Érika, em especial, por aguentarem os meus surtos, e, aos demais, meu muito obrigada pelo enorme apoio!

Ao Vinícius, agradeço os colos, a compreensão, a paciência, a acolhida para eu conseguir chegar até aqui. Você foi essencial!

À Profa. Patrícia agradeço a oportunidade de ingresso no mestrado, por acreditar em mim e ser um exemplo de profissional e ser humano.

À minha orientadora Profa. Mariângela, pelo conhecimento compartilhado, paciência, resiliência e compreensão. Você foi a base para eu chegar até aqui. Obrigada por não desistir!

Ao pessoal do laboratório de genética, Profa. Marly, Profa. Alessandra, Profa. Rose e, também, à Sara, Mariana, Andressa, Helena, Gustavo, Ricardo, Cris, por toda paciência em me ensinar, pelo companheirismo, pela acolhida. Vocês me ensinaram muito!

Um agradecimento especial, à Tayssia, pela disposição em me ajudar, pela amizade e por toda paciência e companheirismo. Você foi crucial!

Agradeço ao Joilson, pelo conhecimento compartilhado e por toda a disponibilidade e paciência.

Ao pessoal dos ambulatórios de Ginecologia Geral, Ginecologia Endócrina, Endocrinologia e Nutrologia, em especial, à Dra. Mariana Kefalás, Dra. Elizabeth Montovani e Dr. Marco

Fábio, pelo espaço nos ambulatórios, por todo conhecimento compartilhado e pelo amor à profissão. Vocês são admiráveis!

Por fim, agradeço a todos da pós-graduação de Biociências Aplicadas e às pacientes, do grupo caso e controle, que dedicaram tempo e disposição para contribuir com este projeto e com a ciência, e ao CNPq pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin

## RESUMO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é considerada uma desordem multifatorial, com alterações genéticas, metabólicas, endócrinas e ambientais, afeta grande parte da população feminina, tratando-se de um importante fator de infertilidade. As informações atuais ainda não permitem estabelecer parâmetros precisos para diagnóstico e prognóstico. Assim, este estudo teve como objetivo a identificação de fatores de risco, consequências clínicas, dados antropométricos, composição corporal, e polimorfismos de deleção dos genes da família glutatona S-transferase *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com SOP, comparando-as com uma população controle. Para isso, duzentas e quarenta mulheres (117 pacientes com SOP e 123 sem SOP) foram avaliadas. Os dados sociodemográficos, fatores de risco e consequências clínicas foram obtidos por meio de questionário e acompanhamento de consultas, já os dados antropométricos foram obtidos com o auxílio de fita métrica e o exame de bioimpedância utilizado possuía sistema tetrapolar. Para a realização dos índices de resistência insulínica foram realizados testes com a insulina de jejum, glicose e triglicérides. A análise molecular foi realizada a partir da coleta de sangue periférico e extração de DNA genômico. A genotipagem foi realizada pela técnica de PCR multiplex. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SSP SS, versão 24 e o nível de significância foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os dados obtidos mostraram que a ausência de gestação, irregularidades menstruais, fatores associados à infertilidade e características clínicas do hiperandrogenismo, foram mais frequentes no grupo de mulheres com SOP. Na análise antropométrica, o aumento de peso e do índice de massa corporal foram associados à SOP. Os índices de resistência insulínica também diferiram entre os grupos. A frequência dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* não apresentou diferença entre os grupos. A análise multivariada evidenciou que o histórico familiar de SOP é mais frequente entre as portadoras de SOP. Dentre os fatores de risco para a síndrome, o histórico de SOP familiar foi associado com a doença, sendo frequente em mulheres do grupo experimental. Para concluir, em nossa casuística, histórico familiar, consequências clínicas da síndrome, peso, IMC e índices de resistência à insulina estão associados à SOP.

**Palavras-chave:** Glutathione S-Transferase, Antropometria, Síndrome do Ovário Policístico

## ABSTRACT

The Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is considered a multifactorial disorder, with genetic, metabolic, endocrine and environmental alterations, affecting a large part of the female population, being an important factor of infertility. The current information does not yet allow to establish precise parameters for diagnosis and prognosis. Thus, this study aimed to identify risk factors, clinical consequences, anthropometric data, body composition, and deletion polymorphisms of the genes of the glutathione S-transferase *GSTT1* and *GSTM1* in patients with PCOS, comparing them with a control population. For this, two hundred and forty women (117 patients with PCOS and 123 patients without PCOS) were evaluated. Socio-demographic data, risk factors and clinical consequences were obtained through a questionnaire and follow-up of consultations. Anthropometric data were obtained with the aid of a tape measure and the bioimpedance test used had a tetrapolar system. Insulin resistance tests were performed with insulin, glucose and triglycerides. Molecular analysis was performed from peripheral blood collection and genomic DNA extraction. Genotyping was performed by the multiplex PCR technique. Statistical analysis was performed using the SSP SS, version 24 and with level of significance was 5% ( $p \leq 0.05$ ). The data obtained showed that the absence of gestation, menstrual irregularities, factors associated with infertility and clinical characteristics of hyperandrogenism were more frequent in the group of women with PCOS. In the anthropometric analysis, increased weight and body mass index were associated with PCOS. The indices of insulin resistance also differed between the groups. The frequency of *GSTT1* and *GSTM1* deletion polymorphisms did not differ between groups. The multivariate analysis showed that the family history of PCOS is more frequent among patients with PCOS. Among the risk factors for the syndrome, the history of familial PCOS was associated with the disease, being frequent in women of the experimental group. To conclude, in our series, family history, clinical consequences of the syndrome, weight, BMI and insulin resistance index are associated with PCOS.

**Key words** Glutathione-Transferase, Body Composition, Polycystic Ovarian Syndrome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Contribuição das alterações bioquímicas para o desenvolvimento das diversas comorbidades na SOP. Uberaba-MG/2018. ....26
- Figura 2** - Problemas reprodutivos associados à SOP ao longo do ciclo de vida da mulher. Uberaba-MG/2018.....28
- Figura 3** - Relação entre os principais aspectos da SOP, resistência insulínica excesso de andrógenos e obesidade. Uberaba-MG/2018.....30
- Figura 4**-Gel de agarose 1,5 % com os produtos das ampliações dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. O amplificado de 480 pb é correspondente ao gene *GSTT1*, o amplificado 312 pb é correspondente ao gene *CYP1A1* (controle de reação) e o amplificado de 219 pb correspondente ao gene *GSTM1*. (CSOP1, CSOP03, CSOP04 e CSOP05) *GSTT1* positivo e *GSTM1* positivo; (CSOP06) *GSTT1* negativo e *GSTM1* positivo; (SOP 19) *GSTT1* positivo e *GSTM1* negativo; (SOP 20) *GSTT1* negativo e *GSTM1* negativo; (BCO) controle negativo e (PM 50 pb): marcador de 50 pares de bases.....54

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Evolução dos critérios de diagnóstico da SOP ao longo do tempo. Uberaba-MG/2018.....	21
<b>Quadro 2</b> - Classificação de obesidade, segundo dados do IMC. Uberaba-MG/2018.....	31
<b>Quadro 3</b> - Artigos publicados no ano de 2018 que mostram associação de polimorfismos com SOP. Uberaba-MG/2018. ....	34
<b>Quadro 4</b> - Reagentes usados no preparo da Solução C. Uberaba-MG/2018. ....	43
<b>Quadro 5</b> - Sequência dos Primers dos Polimorfismos dos genes <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e controle de reação <i>CYP1A1</i> . Uberaba-MG/2018.....	44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição dos fatores de risco (tabagismo, etilismo e histórico familiar), em pacientes com SOP (Caso) e controle. Uberaba-MG/2018.....46
- Tabela 2** - Distribuição das consequências clínicas (Gestação, Menstruação, Fatores associados a infertilidade, Doenças Cardiovasculares, Hirsutismo, Acne, Oleosidade e Queda de Cabelo), em pacientes com SOP e controle. Uberaba-MG/2018.....48/49
- Tabela 3** - Classificação do índice de massa corporal (IMC), das pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.....50
- Tabela 4** - Relação Cintura e Quadril (RCQ), Relação Cintura e Estatura (RCE), índice de conicidade (IC) e índice de avaliação do produto de acumulação lipídica (LAP) das pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.....51
- Tabela 5** - Distribuição dos dados resultantes do exame bioimpedância, em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.....51/52
- Tabela 6** - Distribuição dos valores obtidos pelos Índices de Resistência Insulínica (HOMA-IR, HOMA BcC e Quick) em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.....53
- Tabela 7** - Distribuição genotípica dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*, em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.....55
- Tabela 8**-Distribuição de fatores de risco para SOP e os polimorfismos de deleção estudados do grupo caso e do grupo controle. Uberaba-MG/2018.....56

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ADIPOQ	Adiponectina
AES-PCOS	Androgen <i>Excess Society</i> - <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
ALDH2	Aldeído desidrogenase
ASRM	<i>American Society Reproduction Medicine</i>
CA	Cintura Abdominal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CYP	Citocromo P-450
DEXA	Absortometria Radiológica de Dupla Energia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DO	Disfunção Ovariana
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-Acético
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FTO	Folato
GnRH	Hormônio liberador de Gonadotrofinas
<i>GST</i>	Glutathione S-transferase
<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase mu 1
<i>GSTT1</i>	Glutathione S-transferase theta 1
HA	Hiperandrogenismo
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HOMA	Modelo de Avaliação de Homeostase
IC	Índice de Conicidade
IIC	Intervalo Interquartil
IMC	Índice de massa corporal
Indels	Inserção ou deleção
K+	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilogramas
Kg/m <sup>2</sup>	Quilograma por metro quadrado

KISS1	Kisspeptina
L	Litro
LAP	Produto de Acumulação Lipídica
LH	Hormônio Luteinizante
Ltda	Limitada
m	Metro
M	Molar
mEH	Hidrolase microsossomal
Mg	Magnésio
mg/dL	Miligramas por decilitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
miR	Micro-RNA
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
ng	Nanograma
NICHD	<i>National Institutes of Child Health and Human Disease</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
OA	Oligo/Anovulação
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Bases
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama
RCE	Cintura e estatura
RCQ	Relação Cintura e Quadril
RI	Resistência Insulínica

rpm	Rotação por minuto
SDHEA	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
SM	Síndrome Metabólica
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Tris-EDTA
TGL	Triglicerídeos
Tris-HCl	<i>Tris Hydrochloride</i>
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VDR	Receptor de Vitamina D
Z	Impedância
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1.	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1.1.	Síndrome dos ovários policísticos (SOP): Critérios de diagnóstico .....	21
2.1.2.	SOP: Consequências clínicas .....	23
2.1.3.	SOP: Composição corporal .....	31
2.1.4.	SOP: Aspectos genéticos .....	33
2.1.5.	Glutathione S-transferase (GST) e SOP .....	34
2.2.	JUSTIFICATIVA .....	37
2.3.	OBJETIVO.....	38
2.3.1.	OBJETIVO GERAL .....	38
2.4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
2.4.1.	Aprovação e Consentimento .....	39
2.4.2.	Casuística.....	39
2.4.3.	Fatores de risco e consequências clínicas.....	39
2.4.4.	Análise Antropométrica .....	40
2.4.4.1.	Índice de Massa Corporal (IMC) .....	40
2.4.4.2.	Medidas de cintura e quadril.....	40
2.4.5.	Composição Corporal.....	41
2.4.5.1.	Bioimpedância.....	41
2.4.5.2.	Índices de avaliação de resistência insulínica.....	41
2.4.6.	Análises Moleculares .....	42
2.4.6.1.	Coleta de sangue e separação dos leucócitos .....	42
2.4.6.2.	Extração de DNA genômico .....	42
2.4.6.3.	Quantificação e diluição das amostras de DNA .....	43
2.4.6.4.	Análise dos polimorfismos de deleção.....	44
2.4.7.	Análise estatística.....	45
2.5.	RESULTADOS .....	46
2.5.1.	Fatores de risco e consequências clínicas.....	46
2.5.2.	Dados Antropométricos.....	49

2.5.2.1.	Índices de avaliação de riscos de doenças cardiológicas .....	50
2.5.3.	Composição Corporal.....	51
2.5.3.1.	Bioimpedância.....	51
2.5.4.	Índices de avaliação de Resistência Insulinica .....	52
2.5.5.	Dados Moleculares.....	53
2.5.5.1.	Análise dos polimorfismos de deleção dos genes <i>GSTT1/GSTM1</i> .....	53
2.5.6.	Análise Multivariada .....	55
2.6.	DISCUSSÃO .....	57
2.7.	CONCLUSÃO .....	62
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
4.	ANEXOS.....	72
4.1	Parecer e extensão do Comitê de Ética da UFTM.....	72
5.	APÊNDICES.....	77
5.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Livre e esclarecido para Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos.....	78
5.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Livre e esclarecido para controles.....	79
5.3	Questionário para coleta de dados sócio-demográficos, clínico e exames bioquímicos.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) foi descrita em 1935 por Stein e Leventhal, a partir da associação de diferentes graus de hirsutismo, anovulação, obesidade e aumento bilateral de ovários. Atualmente, para a realização do diagnóstico da SOP, devem estar presentes pelo menos dois dos seguintes critérios: anovulação crônica, sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo (excluindo-se outras etiologias) e ovários policísticos, caracterizados pelo exame ultrassonográfico (ROTTERDAM ESHRE/ASRM, 2004). Trata-se de uma desordem multifatorial, com alterações metabólicas, endócrinas, ambientais e genéticas (MELO *et al.*, 2015; HAYEK *et al.*, 2016).

Dentre as características clínicas, o hiperandrogenismo é caracterizado pelo excesso de hormônios masculinos livres no corpo. Suas manifestações incluem o hirsutismo, irregularidades no ciclo menstrual (HAYEK *et al.*, 2016), acne, e oleosidade da pele (MOURA *et al.*, 2011; ECKLUND; USADI, 2015). A síndrome também tem sido associada a quadros de obesidade (MURRI *et al.*, 2013; MORAN, NORMAN; TEEDE, 2015), resistência insulínica (BAPTISTE *et al.*, 2017) e ainda é considerada uma importante causa de infertilidade feminina (SANTANA *et al.*, 2008).

A obesidade destaca-se tanto como desencadeadora quanto complicadora da SOP (MURRI *et al.*, 2013). O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo e que funciona como depósito de energia na forma de triglicerídeos e produz diversas moléculas envolvidas no controle de muitos processos fisiológicos, como na reprodução. A adiposidade central pode promover o excesso de andrógenos por meio de uma resposta direta dos ovários ou da glândula adrenal aos mediadores inflamatórios ou pelo desenvolvimento indireto de resistência à insulina e também, pode favorecer o estresse oxidativo (MURRI, *et al.*, 2013).

Em relação aos fatores genéticos, alguns genes estão sendo associados com a SOP, como os relacionados com a regulação de hormônios andrógenos, secreção da insulina, de gonadotrofinas (ESCOBAR-MORREALE; LUQUE-RAMÍREZ; SAN MILLÁN, 2005). Entre os genes estudados, a família da glutatona S-transferases (*GST*) desempenha um papel importante no metabolismo dos hormônios esteroides, na manutenção celular e na proteção do organismo ao estresse oxidativo. O gene *GSTT1* (glutatona S-transferase theta 1), localizado no cromossomo 22q11.2, e o gene *GSTM1* (glutatona S-transferase mu 1), localizado em

1q13.3, pertencem à família das glutatonas S-transferases. Polimorfismos de deleção total desses genes já foram associados a diversas patologias, tais como: diabetes mellitus, uma consequência clínica da SOP (DATTA *et al.*, 2011 e REIS *et al.*, 2011), e endometriose, uma condição ginecológica (DING *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014). Um estudo evidenciou a associação desses polimorfismos com SOP (BABU *et al.*, 2004).

A partir das evidências apresentadas, este estudo teve como objetivo a identificação de dados antropométricos, composição corporal e polimorfismos de deleção, dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, em pacientes com SOP, ao compará-las com uma população controle.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob número de protocolo 1796. O estudo teve a participação de duzentas e quarenta mulheres (117 pacientes com SOP e 123 controles).

Dados antropométricos foram obtidos por meio do exame de bioimpedância com sistema tetrapolar e medições de cintura e quadril com fita métrica. A análise molecular foi realizada a partir da coleta de sangue periférico e extração de DNA genômico. A genotipagem foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) multiplex. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SSP SS, versão 24. Os testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para testar a curva de normalidade. Para os dados paramétricos, foi utilizado o teste de T-Student. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste Wilcoxon de Mann Whitney. Para as variáveis quantitativas, foi utilizada a estatística descritiva por meio de frequência (absoluta e relativa) e tendência central e dispersão (média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil). O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para dados categóricos. A regressão logística múltipla foi utilizada para análise dos polimorfismos e fatores de risco da SOP. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

Existem poucos estudos verificando a associação entre SOP e os polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, e, na literatura, não há trabalhos na população brasileira sobre esse tema. Portanto, a deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* podem estar associadas com a etiologia, manifestações clínicas ou com as patologias associadas à SOP.

Portanto, realizar uma avaliação antropométrica e genética envolvendo esses genes pode contribuir para melhor compreensão da etiologia da SOP e colaborar na prevenção e diagnóstico, por meio de possíveis biomarcadores para a doença.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1.1. Síndrome dos ovários policísticos (SOP): Critérios de diagnóstico

Stein e Leventhal, em 1935, realizaram a primeira descrição SOP, por meio da observação de modificações nos ovários, obesidade, hirsutismo e anovulação crônica. Com o desenvolvimento de técnicas capazes de realizara medição das concentrações hormonais, os critérios foram revisados e incluída a secreção alterada de gonadotrofinas e a hiperandrogenemia. Com o desenvolvimento daultrassonografia, foi possível observar a morfologia ovariana, e considerar alterações dessamorfologia, como critério para diagnóstico (ROTTERDAM ESHRE/ASRM, 2004;AZZIZ *et al.*, 2009; ESCOBAR-MORREALE, 2018).

A Quadro 1 sumariza os critérios de diagnósticos de SOP, de acordo com os consensos realizados, nos anos de 1990, 2003,2006 e 2012.

**Quadro1** - Evolução dos critérios de diagnóstico da SOP. Uberaba-MG/2018.

NIH 1990	ESHR/ASRM 2003	AES-SOP 2006	NIH 2012
<b>Presença de dois critérios:</b>	Presença de dois, dos três critérios:	Presença de dois critérios:	Presença de dois, dos três critérios e identificação de fenótipos específicos: I-HA+DO+PCOM II-HA+DO III-HA+PCOM IV-DO+PCOM
<b>Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia</b>	Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia	Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia (Critério Obrigatório)	Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia
<b>Disfunção Menstrual</b>	Disfunção Menstrual	Disfunção Menstrual e/ou ovários policísticos	Disfunção Menstrual
	Ovários policísticos		Ovários policísticos

Legenda: HA: Hiperandrogenismo; OA:Oligo/anovulação; DO: Disfunção Ovulatória;Fonte: Adaptação de (MARCONDES; BARCELLOS;ROCHA, 2013 e LIZNEVAetal., 2016).

Em 1990, em uma conferência coordenada pelo *NationalInstituteofChild Health andHumanDisease*, concluiu-se que os principais critérios para diagnóstico da síndrome deveriam incluir (em ordem de importância): I) hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenia, II) disfunção menstrual, e III) exclusão de outras doenças conhecidas (AZZIZ *et al.*, 2009).

Já no ano de 2003, em uma conferência na cidade de Rotterdam, realizada pela Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia e pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, foi recomendada para o diagnóstico da SOP a presença de pelo menos dois, dos seguintes critérios: anovulação crônica, sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo (excluindo-se outras etiologias) e ovários policísticos, caracterizados pelo exame ultrassonográfico padronizado, ou seja, a presença de pelo menos um dos seguintes achados: 12 ou mais folículos em cada ovário, medindo entre 2-9 mm de diâmetro ou volume ovariano aumentado ( $>10 \text{ cm}^3$ ) (ROTTERDAMESHRE/ASRM, 2004).

Em 2006, especialistas europeus, americanos e australianos, da *AndrogenExcessand PCOS Society*, reuniram-se para realizarem uma revisão sistemática da literatura. Eles concluíram que a SOP é uma doença predominantemente causada pelo excesso de andrógenos, e que o diagnóstico de SOP deve basear-se na presença de alterações clínicas ou bioquímicas de hiperandrogenismo, em combinação com disfunção ovariana, excluindo outras causas. Portanto, incluíram o hiperandrogenismo como critério obrigatório para diagnóstico da síndrome (AZZIZ *et al.*, 2009; LIZNEVA *et al.*, 2016).

Em 2012, o *NationalInstituteofHealth* (NIH) realizou um estudo que analisou os benefícios e desvantagens dos critérios de diagnóstico existentes. A reunião contou com 29 especialistas em SOP de diferentes países, que apresentaram as evidências para o desenvolvimento de um consenso. Como resultado, os especialistas definiram o uso do critério de Rotterdam ESHRE/ASRM 2003, acompanhado de uma descrição detalhada de quatro combinações de fenótipos de SOP. Os quadros fenótipos descritos foram: I - Presença de hiperandrogenismo, Disfunção Ovulatória e Morfologia Policística de Ovário; II - Presença de hiperandrogenismo, Disfunção Ovulatória; III - Presença de hiperandrogenismo e Morfologia Policística de Ovário; IV - Presença de Disfunção Ovulatória e Morfologia Policística de Ovário (NIH, 2012; FAUSER *et al.*, 2012; LIZNEVA *et al.*, 2016).

Ambas as propostas de critérios diagnóstico para a SOP consideram a exclusão de outros distúrbios que podem acometer a mulher, ocasionando quadros de hiperandrogenismo, como as tireoidopatias, hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita não clássica,

amenorreia hipotalâmica, neoplasias virilizantes e síndrome de Cushing (LEGRO *et al.*, 2013).

Atualmente, o diagnóstico da SOP é realizado utilizando os critérios de Rotterdam ESHRE/ASRM 2003, acompanhados da identificação dos fenótipos específicos e considerando, ainda, as demais manifestações clínicas (NIH, 2012; FAUSER *et al.*, 2012; LIZNEVA *et al.*, 2016).

Apesar de ser denominada “Síndrome do Ovário Policístico”, o termo “policístico” tem sido considerado errôneo, pois refere-se ao acúmulo de folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação e /ou atresia. O nome atribuído à SOP é confuso tanto para profissionais da saúde quanto para pacientes e seus familiares, causando preocupações errôneas sobre o potencial para malignidade de tais “cistos”. Dada a falta de evidências sólidas sobre fisiopatologia da síndrome, os diferentes nomes propostos geraram conflitos e não há uma nova nomenclatura adotada (ESCOBAR-MORREALE, 2018).

### **2.1.2 SOP: Consequências clínicas**

A SOP é uma endocrinopatia comum em mulheres em idade reprodutiva (MOURA *et al.*, 2011). Ocasiona alterações como o hiperandrogenismo bioquímico e clínico, anovulação, obesidade, aspecto policístico dos ovários, síndrome metabólica, entre outras consequências clínicas (FERREIRA *et al.*, 2008).

Em condições normais, ovários e glândulas adrenais contribuem de forma equivalente para produção da estereoidogênese. A secreção de andrógenos pelos ovários é dependente das concentrações de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante). A maioria dos autores considera que a estereoidogênese anormal, de origem ovariana ou adrenal, seja a desordem primária da SOP. Desde a descrição da síndrome, foi enfatizado que uma relação aumentada de LH/FSH é uma das alterações. Foi sugerido, também, que uma das causas da doença pode ser o aumento da frequência da liberação dos pulsos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula as células da teca a produzirem andrógenos e diminui os níveis de FSH (BEDNARSKA;SIEJKAB, 2017).

A SOP é considerada a principal causa de hiperandrogenismo, no sexo feminino, caracterizando dois terços das mulheres hiperandrogênicas. Além disso, todas as propostas de diagnósticos para SOP incluem a presença de hiperandrogenismo como um de seus critérios (AZZIZ, 2006; NIH, 2012).

O hiperandrogenismo é o termo utilizado para denominar os sinais clínicos do aumento da ação dos androgênios. Na clínica, manifesta-se pela presença de quadros variáveis de hirsutismo, acne, seborréia e alopecia androgênica (ESCOBAR-MORREALE, 2018). Bioquimicamente, caracteriza-se pelos níveis elevados de androgênios séricos, sendo representado principalmente por um valor aumentado de testosterona (MARCONDES; BARCELOS; ROCHA, 2011).

Em relação ao hiperandrogenismo bioquímico, na mulher, a maior parte da testosterona circulante origina-se da conversão periférica de outros esteróides (principalmente androstenediona), a outra parte provém das suprarrenais e dos ovários. O aumento da testosterona livre é definido pelas alterações de hormônios mais associados aos quadros de hiperandrogenismo (MARCONDES, BARCELOS e ROCHA, 2011; GOODMAN *et al.*, 2015). Porém, concentrações aumentadas do hormônio sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) são observadas em 25% das pacientes, podendo ser o único andrógeno alterado em 10% delas.

A intensidade e a extensão das manifestações clínicas dependem de inúmeros fatores e a correlação entre a intensidade do quadro clínico e as concentrações bioquímicas não estão estabelecidas (GOODMAN *et al.*, 2015).

O hirsutismo é o principal sinal clínico associado ao quadro hiperandrogênico. Para realizar a sua caracterização e o seudiagnóstico, é utilizada a escala Ferriman-Gallwey, na qual uma pontuação de 1 a 4 é atribuída para avaliar o crescimento anormal de pelos em zonas terminais, em nove áreas do corpo. Um escore, com soma inferior a 8, é considerado normal, de 8 a 15, indica um quadro de hirsutismo leve e, um escore superior a 15, hirsutismo moderado ou grave (FERRIMAN; GALWWEY, 1961; FLORES; FLORES; COMIM, 2013).

A acne provoca lesões de pele que normalmente se apresentam na face, pescoço, dorso e região peitoral, causadas por uma desordem da unidade pilo-sebácea. O aumento da secreção dos andrógenos eleva o número das glândulas sebáceas, ao ocasionar uma maior produção de sebo, e, ainda, uma descamação anormal das células do epitélio folicular. Esses fatores são responsáveis pela formação dos comedões que, combinados com a colonização do folículo pelo *Propionibacterium acnes*, resultam no progressivo aparecimento de pápulas, pústulas, nódulos, cistos e inflamações. Inúmeros estudos tentam correlacionar a apresentação clínica da acne com marcadores de hiperandrogenismo, mas os resultados são controversos (MOURA *et al.*, 2011).

Já a alopecia androgênica, é caracterizada pela perda de cabelos na região do couro cabeludo, podendo ocorrer de maneira difusa, ou em determinadas regiões, como frontal e parietal (MOURA *et al.*, 2011). Na presença de andrógenos, os folículos terminais sofrem miniaturização, transformando-se em *pelos vellus*, sendo esses macios, não pigmentados ou contendo pouco pigmento, geralmente, medindo menos de 2 mm comprimento (YILDIZ, 2006; MOURA *et al.*, 2011; FLORES; FLORES; COMIM, 2013).

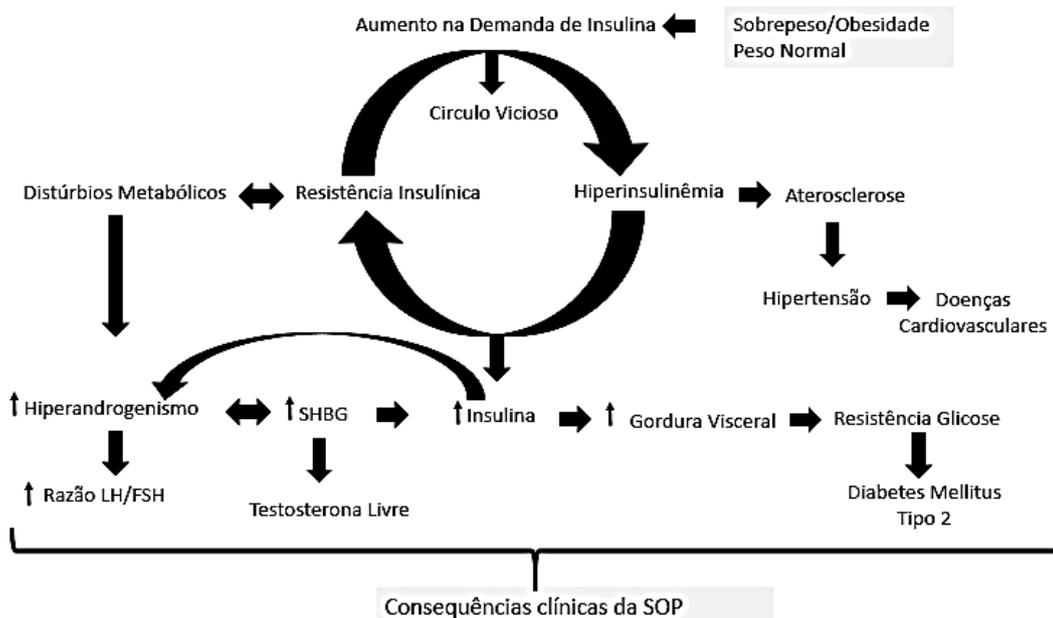
Um dos fatores que pode contribuir para o excesso de andrógenos é a Resistência Insulínica (RI) e a hiperinsulinemia compensatória, pois a insulina atua como uma gonadotrofina no ovário facilita a secreção nas glândulas adrenais e modula a pulsatilidade do LH (BEDNARSKA; SIEJKAB, 2017).

A RI é caracterizada pela resposta inapropriada, principalmente nos tecidos periféricos, à ação da insulina (FONTES-CARVALHO, 2015). A RI também pode ser definida como um estado metabólico, no qual o mecanismo de homeostase da glicose normal falha em funcionar de forma adequada e está presente em 50 a 90% das mulheres com SOP (FONTES-CARVALHO, 2015).

A célula normal é capaz de reconhecer a presença da resistência à insulina e aumentar sua secreção, ocasionando a hiperinsulinemia. O nível circulante de insulina em indivíduos normais é de 6 a 15  $\mu\text{IU} / \text{mL}$ . Nas mulheres com SOP, o nível sobe para 22  $\mu\text{IU} / \text{mL}$  (JOSH *et al.*, 2014). A hiperinsulinemia é considerada um fator causal para hiperandrogenemia, pois a insulina pode induzir diretamente o excesso de produção de andrógenos pelas células da teca (SHAO; ESPENSHADE, 2012).

Há uma hipótese que os resultados das consequências clínicas da SOP resultam de um círculo vicioso, pois o excesso de andrógeno favorece a deposição de gordura abdominal e visceral, pela indução da resistência à insulina e à hiperinsulinemia, a facilitar a secreção de andrógenos nos ovários e glândulas adrenais (ESCOBAR-MORALE, 2018). A Figura 1 resume as possíveis interações entre o desbalanço hormonal e as consequências bioquímicas e clínicas da SOP.

**Figura 1** -Contribuição das alterações bioquímicas para o desenvolvimento das diversas comorbidades na SOP. Uberaba-MG/2018.



Fonte: adaptação de ALI, 2015.

Essa cascata de efeitos, de compensações e de respostas do tipo feedback pode ampliar diversos efeitos negativos da SOP e outros efeitos secundários. A partir desse quadro pode ocorrer o desenvolvimento e o estabelecimento da Síndrome Metabólica (SM), um conjunto de alterações endocrinológicas e metabólicas que incluem resistência à insulina/hiperinsulinemia, obesidade central, dislipidemia e hipertensão (ALI, 2015; BEHBOUDI-GANDEVANI *et al.*, 2018). A SM é mais comum em mulheres com SOP, devido à alta prevalência nessas mulheres de resistência à insulina, obesidade e obesidade visceral, o que corrobora a existência desse círculo vicioso (BEHBOUDI- GANDEVANI *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico da SM, um consenso de vários grupos de trabalho propôs que a presença de três, dos cinco critérios seguintes, são suficientes para o diagnóstico de síndrome metabólica: 1) Circunferência da cintura aumentada; 2) Triglicérides iguais ou maiores que 150 mg/dL; 3) Redução de HDL-colesterol a menos de 40 mg/dL em homens e menos de 50 mg/dL em mulheres; 4) Pressão arterial no limite superior da normalidade ou hipertensão (PAS  $\geq$  130 mmHg e/ou PAD  $\geq$  85 mmHg); 5) Glicemia em jejum igual ou maior que 100 mg/dL. Esses critérios também levam em conta que os parâmetros analisados que apresentaram normalidade podem ter assim se apresentado devido à utilização de medicamentos (LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2014).

A existência de resistência à insulina, em ambas as condições, aumenta a chance de hiperinsulinemia, e pode também promover ganho de peso, ao originar um ciclo vicioso. Além disso, a diferenciação entre as causas de distúrbios metabólicos desenvolvidos se torna mais difícil no contexto do ciclo, pois obesidade e obesidade abdominal, hiperinsulinemia, dislipidemia e intolerância à glicose e síndrome metabólica estão frequentemente presentes em mulheres com SOP (ALI, 2015).

A SOP é também considerada uma das causas mais comuns de infertilidade, devido à ausência de ovulação (anovulação), característica da Síndrome (ALI, 2015).

O ovário é composto por duas zonas distintas: o córtex e a medula. No córtex, observa-se folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e, após a ovulação, a formação de um corpo lúteo. A medula ocupa uma região central e formam a teca dos folículos. O processo denominado foliculogênese acontece quando os folículos imaturos (primordiais) se tornam folículos pré-ovulatórios. O único oócito dos folículos primordiais é cercado por uma única camada de células somáticas achatadas, denominadas células da granulosa (CRAIG; WANG; FLAWS, 2011).

Durante a foliculogênese, as células da granulosa se ativam e proliferam, formando múltiplas camadas ao redor do oócito, reguladas por fatores de crescimento e citocinas produzidas localmente. Ao longo desse processo, o oócito cresce e as células da teca são recrutadas para a estrutura folicular, dependendo da atuação do FSH, a principal gonadotrofina requerida por esses folículos. O antro é formado ao final da foliculogênese, quando o folículo se encontra cheio de líquido, conhecido como folículo antral (CRAIG; WANG; FLAWS, 2011; WANG *et al.*, 2012).

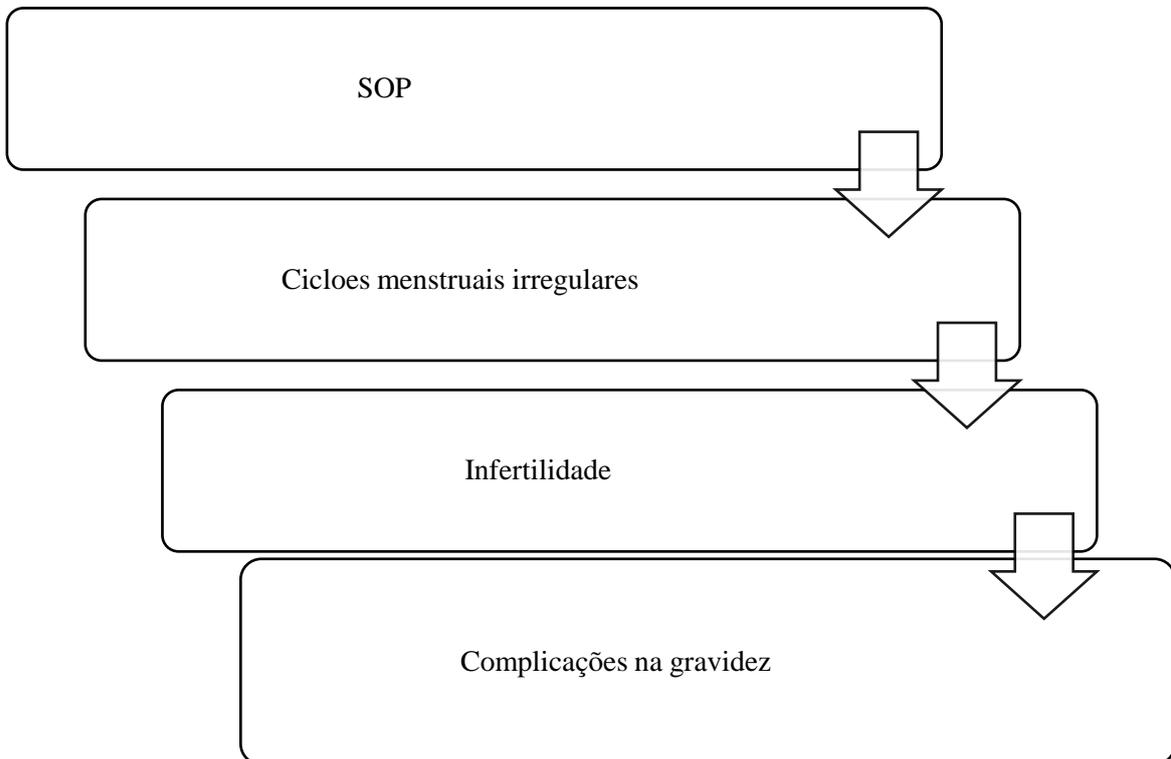
Como resultado do desbalanço nos hormônios sexuais femininos, há a formação de cistos nos folículos antrais ovarianos. A conversão do oócito em cisto, denominado “cisto funcional”, impede a ovulação. Esse bloqueio resulta na alteração do ciclo menstrual ou amenorreia. Os múltiplos cistos formados caracterizam a SOP e, somada a ausência de ovulação e ciclo menstrual irregular, impedem a fertilização e concepção (PATEL *et al.*, 2018).

A infertilidade atinge cerca de 40% das pacientes com SOP. As pacientes SOP possuem um número normal de folículos primordiais primários e seus folículos secundários são significativamente aumentados. Entretanto, há uma alteração no desenvolvimento folicular ao atingir a medida de 4 a 8 mm. Assim, os folículos dominantes não se desenvolvem e a ovulação não prossegue. Os abortos espontâneos também são mais frequentes em SOP, com

uma incidência de cerca de 42% (SIRMANS; PATE, 2014). O trabalho de Joham e colaboradores (2015) mostrou que a infertilidade em pacientes com SOP foi 15 vezes maior quando comparada ao grupo de controle, independente do Índice de Massa Corporal (IMC).

Em geral o quadro de infertilidade causado pela SOP é caracterizado pela presença de oligo ou anovulação, hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico e alterações ovarianas. As alterações causadas pelo excesso de androgênios estão associadas à resistência à insulina e à hiperinsulinemia, bem como estão diretamente relacionadas à irregularidade menstrual, a principal causa associada à infertilidade feminina. A Figura 2 sumariza as principais alterações que podem ocorrer durante o período reprodutivo da mulher com SOP.

**Figura 2** - Problemas reprodutivos associados à SOP ao longo do ciclo de vida da mulher. Uberaba-MG/2018.



Fonte: Adaptação MORAN; NORMAN; TEEDE, 2015.

Destaca-se ainda que, em geral, as mulheres com SOP podem apresentar baixa qualidade de óocitos e a receptividade endometrial diminuída (ROTTERDAM ESHRE/ASRM, 2004).

As mudanças hormonais são associadas também a complicações geradas durante as gestações, a saber, diabetes gestacional e hipertensão gestacional (MORAN; NORMAN; TEEDE, 2015).

Mesmo sem a ocorrência da gravidez, diversos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares podem ocorrer nas mulheres com SOP, tais como: obesidade, resistência à insulina, hipertensão, problemas de coagulação, hiperandrogenismo (ORIO *et al.*, 2016). A Figura 1 mostra que uma das alterações que ocorre em SOP (hiperinsulinemia) pode estar associada a doenças cardiovasculares.

Em uma meta análise realizada, observou-se o risco de doenças coronarianas não fatais e acidentes vasculares cerebrais em pacientes com SOP e, após a análise de 1340 artigos, foi constatado um risco duas vezes maior para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres com SOP (GROOT *et al.*, 2011).

Um estudo de coorte, realizado no Reino Unido, analisou mulheres com SOP, durante 20 anos, e mostrou uma alta prevalência de infarto agudo do miocárdio e angina em mulheres com SOP. Ainda, demonstrou que a idade, a hipertensão e o tabagismo obtiveram correlações com resultados cardiovasculares em portadoras de SOP (MANI *et al.*, 2012).

Há diversos hormônios e citocinas que são secretados ou possuem alterações na produção, durante um quadro de obesidade, uma das consequências clínicas da síndrome, o que contribui amplamente para um estado pré-inflamatório e diversos danos oxidativos. Esses distúrbios podem favorecer a disfunção do tecido endotelial e progressão da aterosclerose. Já a gordura visceral possui um papel fundamental nas alterações do metabolismo lipídico e da resistência à insulina, o que também predispõe a doenças cardiovasculares (CONWAY *et al.*, 2014; ORIO *et al.*, 2016).

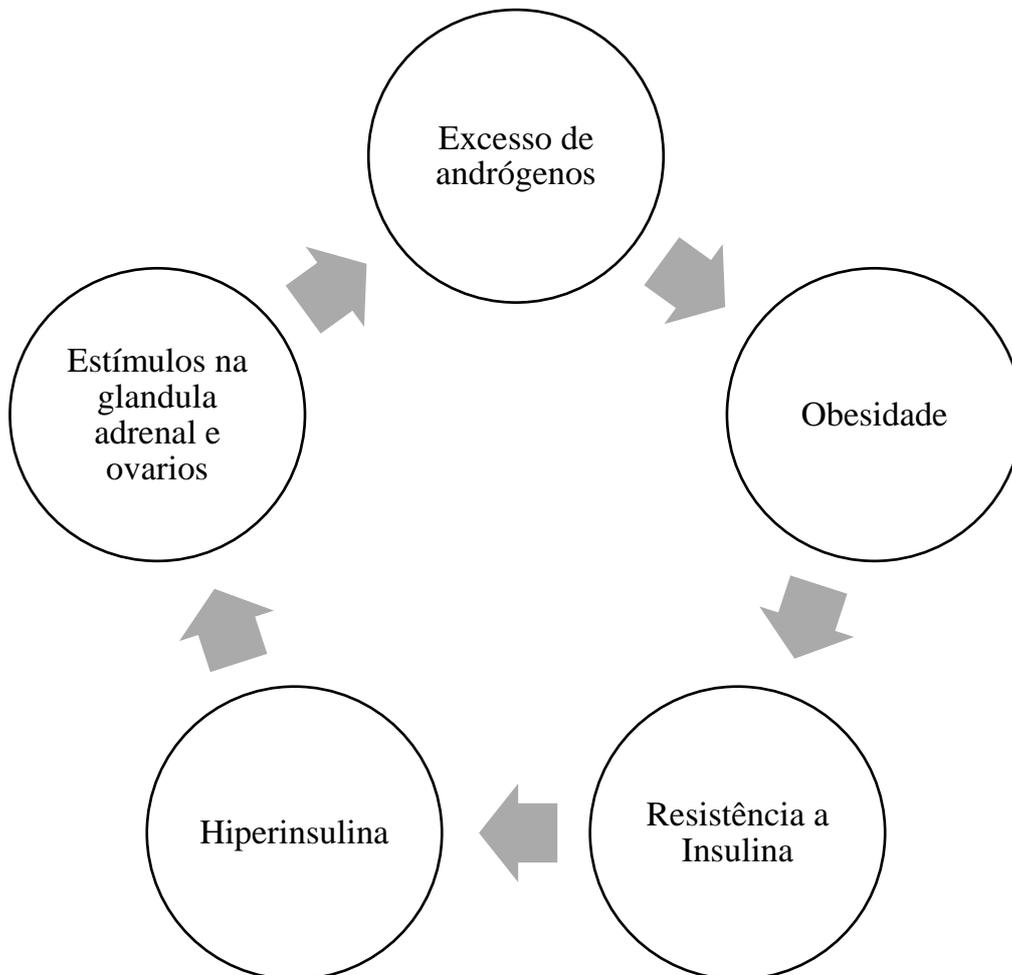
A obesidade é um problema grave e cada vez mais recorrente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 1980, a população mundial obesa aumentou, o que pode levar a comorbidades que resultam em óbito (WHO, 2017).

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo e que funciona como depósito de energia na forma de triglicerídeos. Esse tecido produz ainda diversas moléculas envolvidas no controle de muitos processos fisiológicos, como por exemplo, na reprodução, na homeostase da glicose, na produção de hormônios esteróides e na imunidade (ORIO *et al.*, 2016).

A adiposidade central pode promover o excesso de andrógenos, por meio de uma resposta direta dos ovários ou da glândula adrenal aos mediadores inflamatórios, ou pelo desenvolvimento indireto de resistência à insulina e à hiperinsulinemia compensatória, o que

igualmente pode favorecer o estresse oxidativo, como ilustrado na Figura 3 (MURRI *et al.*, 2013).

**Figura 3** - Relação entre os principais aspectos da SOP, resistência insulínica, excesso de andrógenos e obesidade. Uberaba-MG/2018.



Fonte: Adaptado de ESCOBAR-MORREALE, 2018.

Muitas mulheres com SOP são obesas, embora a prevalência de obesidade na SOP não ser conhecida, pois difere de acordo com a etnia, a localização geográfica e até o status social. Essas mulheres são consideradas obesas abdominais, quando do aumento da relação cintura-quadril, na concentração de andrógenos que pode predispor ao acúmulo abdominal de tecido adiposo (SAM, 2015).

### 2.1.3 SOP: Composição corporal

A obesidade e a distribuição de gordura desempenham um papel importante na etiologia da SOP, pois cerca de 40% das mulheres com a síndrome são obesas e apresentam gordura abdominal (LEGRO, 2012).

A composição corporal é definida a partir das porcentagens de adipócitos, da massa magra e do volume de água no corpo (STEFANAKI *et al.*, 2018). Existem diferentes métodos utilizados para avaliação da composição corporal, classificados em diretos, indiretos e duplamente indiretos. O único método considerado direto é a dissecação de cadáveres. Os métodos indiretos consistem nas medidas quantitativas dos diferentes componentes corporais, por meio de princípios físicos e químicos, como a pesagem hidrostática, ahidrometria, a plestimografia e a absorptometria radiológica de dupla energia (DEXA). Por sua vez, os duplamente indiretos são aqueles que utilizam equações de regressão que tomam como padrão de referência os métodos indiretos, como a bioimpedância elétrica e a antropometria (MONTEIRO; FERNANDES-FILHO, 2002).

O índice de Massa Corporal (IMC) é um índice simples, comumente usado para classificar baixo peso, sobrepeso e obesidade em adultos. É definido como o peso em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura em metros ( $\text{kg/m}^2$ ) (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016). Na população brasileira, tem-se utilizado a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de sobrepeso e obesidade, conforme descrito no Quadro 2.

**Quadro 2** - Classificação de obesidade, segundo dados do IMC. Uberaba-MG/2018.

IMC	Classificação	Grau/Classe Obesidade
<18,5	Magro ou baixo peso	0
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0
30-34,9	Obesidade	I
34,9-39,9	Obesidade	II
≥40	Obesidade	III

Fonte: Adaptação de DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016.

Embora o cálculo de IMC possa ser simples, sua interpretação apresenta algumas dificuldades e discussões sobre o estabelecimento e representação dos pontos de corte referenciais (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016).

O IMC não distingue massa gordurosa de massa magra, podendo ser menos preciso em indivíduos mais idosos, em decorrência da perda de massa magra e diminuição do peso, e superestimado em indivíduos musculosos por não refletir a distribuição da gordura corporal. Outro método para aferir a composição corporal é a bioimpedância, ou também conhecida como impedância elétrica, que se apresenta como sendo seguro, não dependente do observador, barato e fácil de aplicar (FOSBOL; ZERAHN, 2015).

A técnica da bioimpedância foi originalmente descrita, na década de 1960, porém, passou a ser frequentemente utilizada a partir de 1980 (KHALIL; MOHKTAR; IBRAHIM, 2014). Ela é fundamentada no princípio de que os tecidos corporais oferecem diferentes oposições à passagem da corrente elétrica, e tal oposição é denominada impedância (Z). Dessa forma, tecidos com pouca água, como o osso, o tecido adiposo e a pele, são maus condutores, oferecendo grande resistência; enquanto o músculo, sangue e vísceras, devido à elevada quantidade de fluídos e eletrólitos presentes, são bons condutores, oferecendo baixa resistência (KYLE *et al.*, 2004; BRITTO e MESQUITA, 2008; RAMOS, 2014; FOSBOL; ZERAHN, 2015).

Na prática, são colocados 4 eletrodos nas zonas distais do corpo, que emitem uma frequência de 50Hz, sendo medida em seguida a impedância (MANUAL Inbody S10, 2010).

Há uma escassez de estudos, na literatura, com o objetivo de analisar a composição corporal por meio de bioimpedância em SOP. O estudo de Geronikolou e colaboradores (2017) analisou medidas de bioimpedância em adolescentes com SOP, e observou diferenças estatisticamente significantes nas características da composição corporal entre pacientes com SOP e controles.

Os dados antropomórficos e antropométricos são utilizados ainda para avaliar riscos de doenças cardiovasculares, como a Relação Cintura e Quadril (RCQ) (LOHMAN *et al.*, 1984; LIMA *et al.*, 2016) e Cintura e estatura (RCE) (MAFFEIS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2011) o índice de conicidade (IC) (PITANGA; LESSA, 2004), e o índice de avaliação do produto de acumulação lipídica (LAP) (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

#### 2.1.4 SOP: Aspectos genéticos

A etiologia multifatorial da SOP é sustentada por uma complexa arquitetura genética, que apenas recentemente começou a ser explorada, por meio da análise de genes candidatos, que elucidou a participação de vários genes na determinação do risco para a SOP ou como modificadores genéticos de fenótipos componentes da síndrome. A crescente lista de genes de suscetibilidade à SOP contribui para a compreensão de caminhos e processos implicados na etiologia da síndrome (JONES; GOODARZI, 2016).

As análises de agregação familiar indicam que essa síndrome é definida pela complexidade de interações e de origem poligênica. Variações nos genes, responsáveis pela biossíntese e pela regulação de hormônios esteróides, são indicadas como principais responsáveis pela ocorrência dessa patologia, que apresenta uma herdabilidade de 70% em gêmeos homozigotos (AZZIZ, 2016)

Os conhecimentos das bases genéticas da SOP são recentes, segundo Hayes e colaboradores (2015), que reportaram em um estudo abrangente de 984 portadoras da síndrome. Nesse, três loci obtiveram significância na análise genômica (8p23.1, 11p14.1), os loci 9q22.32, 11q22.1, 12q13.2, 12q14.3, 16q12.1, 19p13.3, 20q13.2 tiveram sua ocorrência descrita em mulheres chinesas por Shi e colaboradores (2012), com cerca de 744 mulheres portadoras e um grupo controle de 895 outras.

Os polimorfismos de DNA são variações nas sequências de DNA superior a 1% da população. Eles podem ser classificados de acordo com a forma como a sequência varia entre os alelos. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs do inglês “*SingleNucleotidePolymorphisms*”) são observados em média uma vez a cada 1.000 pares de bases (pb) do genoma e são muito utilizados em pesquisas de suscetibilidade genética a doenças. Há ainda uma segunda classe de polimorfismos que resulta de variações causadas por inserção ou deleção (*indels*), ao variar de um único par de base até aproximadamente 1.000 pb (THOMPSON; THOMPSON, 2016).

O Quadro 3 mostra trabalhos realizados no ano de 2018 que mostram a associação de SOP com polimorfismos.

**Quadro3** - Artigos publicados no ano de 2018 que mostram associação de polimorfismos com SOP.Uberaba-MG/2018.

<b>Autores</b>	<b>Polimorfismos/Gene</b>	<b>Conclusão do estudo</b>
ALBALAWI <i>et al.</i> ,2018	rs4889/ <i>KISS1</i>	Associação do polimorfismo com o risco de SOP
SANTOS; LECKE;SPRITZER,2018	rs7975232/ <i>VDR</i>	Associação do polimorfismo com SM em mulheres com SOP.
EBRAHIMI <i>et al.</i> ,2018	rs2910164/ <i>miR-146a</i>	Associação do polimorfismo com o risco de SOP.
ALFAQIH <i>et al.</i> ,2018	rs1501299/ <i>ADIPOQ</i>	Associação do polimorfismo como protetor para SOP.
DEDACHANJI <i>et al.</i> ,2018	-9676/c / <i>PONI</i>	Associação do polimorfismo como protetor para SOP.
LIU <i>et al.</i> ,2018	rs8050136 e rs1588413 / <i>FTO</i>	Associação do polimorfismo com o risco de SOP.
CZECZUGA-SEMENIUK <i>et al.</i> ,2018	rs1299/ <i>ADIPOQ</i>	Associação do polimorfismo com o risco de SOP.
DALLEL <i>et al.</i> ,2018	rs10818854 e rs10986105 / <i>DENNDIA</i>	Associação do polimorfismo com o risco de SOP.

Fonte: Autora, 2018.

### 2.1.5 Glutationa S-trasferase (GST) e SOP

A preservação das funções celulares fisiológicas depende do equilíbrio homeostático entre oxidantes e antioxidantes. O excesso de espécies reativa do oxigênio (ERO) domina o sistema de defesa antioxidante natural do corpo, ao criar um ambiente inadequado para as reações fisiológicas femininas, ou seja, células e tecidos reprodutivos permanecem estáveis, quando o status oxidante/antioxidante está equilibrado. Estresse oxidativo, geralmente conhecido pela presença na SOP de mulheres, independentemente de serem magras ou terem problemas metabólicos e anormalidades, foi documentado em mulheres SOP inférteis (HYDERALI; MALA, 2015).

A família das enzimas glutationas transferase (GSTs) participam da fase 2 do metabolismo de xenobióticos, compostos químicos estranhos ao organismo humano. As GSTs desempenham, ainda, um papel importante no metabolismo dos hormônios esteróides e na

manutenção celular e na proteção do organismo ao estresse oxidativo (BABU *et al.*, 2004; CARMONA-RUIZ *et al.*, 2015).

O metabolismo de xenobióticos ocorre, principalmente no fígado, e é verificado em duas etapas: na fase I, a ativação dos compostos e, na fase II, a conjugação e a detoxificação dessas substâncias que, posteriormente, são transportadas e excretadas. As enzimas envolvidas nesse metabolismo de xenobióticos, incluindo as Glutathione S-transferases (GSTs), o citocromo P-450 (CYPs), o aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), e a Epóxide Hidrolase Microsomal 1 (mEH), possuem um papel importante no processo de detoxificação de muitas substâncias endógenas e exógenas, tóxicas ao organismo, incluindo alguns produtos produzidos no próprio corpo pelo metabolismo incompleto (HUBER;ALMEIDA,2008).

A família das GSTs desempenha, também, um importante papel no desenvolvimento de um único folículo no ovário, onde o mau funcionamento desses mecanismos pode resultar na formação de múltiplos cistos no ovário. Ou seja, alterações nas atividades dessas enzimas podem comprometer o tecido ovariano, ao levar à formação de vários cistos. Portanto, o estresse oxidativo pode ter importante papel nas alterações metabólicas decorrentes da obesidade, desempenhando um papel na fisiopatologia da SOP (CARMONA-RUIZ *et al.*, 2015).

O trabalho de Kudorglu e colaboradores (2012) observou a relação das enzimas *GST* com a SOP e demonstrou a existência de associação entre o estresse oxidativo e a infertilidade. Diante das propriedades de detoxificação da família de enzimas *GST*, supõe-se que as ausências de atividade dessas enzimas, devido ao polimorfismo de deleção, podem predispor as mulheres a risco aumentado para SOP.

Entre os genes da família das GSTs estão o *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1), localizado no cromossomo 22q11.2, e o *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1), o cromossomo 1q13.3. Os dois genes apresentam um polimorfismo genético ocasionado por deleção total do gene, resultando no genótipo homocigoto nulo (*GSTT1*-nulo e *GSTM1*-nulo), caracterizado pela ausência de atividade enzimática dessas isoformas (KOCH *et al.*, 2010). Polimorfismos de deleção desses genes já foram associados a diversas condições patológicas, tais como: diabetes mellitus, uma consequência clínica da SOP (DATTA *et al.*, 2011 e REIS *et al.*, 2011), e endometriose, uma condição ginecológica (DING *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014).

Um único estudo foi realizado para verificar a associação entre SOP e os polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* (BABU *et al.*, 2004). Esse estudo também analisou polimorfismos no gene *CYP11A1*, e concluiu que a presença do genótipo mutante do *CYP11A1* (T6235C), em combinação com genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1*, pode causar um desequilíbrio entre fase I e a fase II enzimas, ao representar um fator de risco para a SOP.

Vários trabalhos vêm identificando biomarcadores em pacientes com SOP. Esses parâmetros estão presentes ou ausentes ou em níveis aumentados ou diminuídos em pacientes SOP, comparadas a mulheres sem a síndrome (PATEL, 2018).

Alguns exames bioquímicos são utilizados como biomarcadores para SOP, principalmente, as dosagens de androgênios (Testosterona e SDHEA) e os hormônios sexuais (LH e FSH) (GOODMAN *et al.*, 2015; BEDNARSKA; SIEJKAB, 2017).

Além disso, considerando a característica multifatorial da síndrome, estudos de polimorfismos genéticos, relacionados à ação e à regulação de androgênios, genes envolvidos na resistência insulínica e no processo inflamatório crônico e aterosclerose, estão sendo realizados com o intuito de desenvolver biomarcadores para a síndrome e auxiliar na compreensão da etiologia (AZZIZ, 2016).

Outro ponto importante, dada a relação ainda não estabelecida entre a síndrome e a obesidade, é o estudo de dados antropométricos e bioimpedância, a fim de conhecer possíveis características, típicas de pacientes portadoras de SOP (SAM, 2015). Índices como relação cintura/quadril, relação cintura/estatura, dentre outros, são ferramentas frequentemente utilizadas para avaliar riscos de doenças cardiovasculares (PEREIRA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2016). Além disso, dados resultantes do exame de bioimpedância, como percentual de gordura, massa livre de gordura, podem elucidar mais sobre a influência da síndrome na composição corporal (GERONIKOLOU *et al.*, 2017). Portanto, realizar uma avaliação antropométrica e genética envolvendo esses genes pode contribuir para melhor compreensão da etiologia da SOP e colaborar na prevenção e diagnóstico, por meio de possíveis biomarcadores para a doença.

## 2.2. JUSTIFICATIVA

A SOP é um distúrbio endócrino comum em mulheres na idade reprodutiva com etiologia ainda não totalmente estabelecida. É ainda considerada a principal causa de infertilidade feminina no mundo.

Estudos que analisaram os dados antropométricos e resultados de bioimpedância são poucos e mostram resultados controversos. Um único estudo foi realizado para verificar a associação entre a SOP e os polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e observou uma relação da deleção com a SOP. Esses genes estão relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao estresse oxidativo que, por sua vez, pode ter relação com as consequências clínicas da SOP.

Assim, diante dos controversos resultados presentes na literatura, e dos estudos de dados antropométricos e bioimpedância, dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, na população brasileira, realizar uma avaliação antropométrica, de bioimpedância e genética, com a avaliação da deleção desses genes, pode contribuir, para a compreensão da etiologia da SOP na busca de biomarcadores para o diagnóstico dessa doença.

## **2.3.OBJETIVO**

### **2.3.1 OBJETIVO GERAL**

Com base nas evidências apresentadas, este estudo teve como objetivo verificar a associação de fatores de risco, consequências clínicas, dados antropométricos, composição corporal, e polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com SOP, comparando-as com uma população controle, não portadora de SOP e de outras patologias androgênicas.

### **2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A) Avaliar os fatores de risco e consequências clínicas em mulheres com SOP e em uma população controle.
- B) Avaliar os dados antropométricos e composição corporal entre os grupos SOP e controle.
- C) Avaliar os índices de Resistência Insulínica e compará-los entre os grupos SOP e controle
- D) Avaliar a frequência e a associação dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* comparando os grupos com SOP e população controle.
- E) Avaliar a associação dos polimorfismos com os fatores de risco para SOP entre os casos e controles.

## **2.4.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.4.1 Aprovação e Consentimento**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob protocolo 1796, com extensão aprovada para o estudo desses polimorfismos (Anexo I). As mulheres que concordaram em participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices I e II).

### **2.4.2. Casuística**

Duzentas e quarenta mulheres (117 pacientes portadoras da SOP e 123 controles) foram incluídas no estudo, durante os anos de 2012 e 2017. O recrutamento de pacientes e controles foi realizado nos ambulatórios de Ginecologia Geral, Ginecologia Endócrino e Endocrinologia, do Ambulatório Maria da Glória, da UFTM, situado no município de Uberaba, MG, Brasil.

O grupo de casos (composto por 117 mulheres com a SOP), foi escolhido a partir dos seguintes critérios: estar em idade reprodutiva e ser diagnosticada com a SOP, de acordo com os critérios de Rotterdam (ROTTERDAM ESHRE/ASRM, 2004). Já o grupo controle foi constituído por 123 mulheres em idade reprodutiva, sem histórico ou sinal da SOP.

Como critério de exclusão, não foram avaliadas pacientes com síndrome de Cushing, deficiência de 21-hidroxilase, disfunção da tireoide, hiperprolactinemia, diabetes, tumores secretores de andrógenos, anti-andrógenos, estatinas, glicocorticóides ou medicações para infertilidade.

### **2.4.3. Fatores de risco e consequências clínicas**

Para a coleta de dados foi realizado um questionário com as mulheres para levantamento de fatores de risco (hábitos de tabagismo e etilismo e histórico da SOP familiar). Foi realizado também o levantamento de dados clínicos, sobre as consequências clínicas da SOP, como paridade (número de gestações, número de partos, número 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, índice de

massa corporal (IMC).Esses dados foram levantados pelo acompanhamento, durante as consultas médicas.

#### **2.4.4. Análise Antropométrica**

##### **2.4.4.1.Índice de Massa Corporal (IMC)**

Para a análise do IMC foram utilizados os dados de peso (em Kg) e altura (em metros), obtidos no acompanhamento das consultas ambulatoriais das mulheres participantes. O índice foi obtido por meio da fórmula (Peso (kg) / Altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)).

Este trabalho considerou a classificação proposta pelas Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2016) que considera como Magro ou Baixo Peso, pacientes com IMC inferior a 18,5; Normal ou eutrófico, com IMC entre 18,5 e 24,9. Sobrepeso ou pré-obeso, com IMC entre 25 e 29,9; Obesidade grau I, com IMC entre 30 e 39,9; Obesidade grau II, com IMC entre 34,9 e 39,9 e Obesidade grau III, com IMC acima de 40.

##### **2.4.4.2.Medidas de cintura e quadril**

Para análise antropométrica, foram realizadas medições por meio de fita métrica, da região da cintura e quadril de 25 pacientes controles e 25 pacientes com a SOP. Esse recorte da amostra se deu devido à disponibilidade das pacientes para a realização do exame quando contatadas.

A circunferência de cintura e/ou abdominal foi obtida observando a menor circunferência entre a borda da última costela e a crista ilíaca (no centro do abdômen, geralmente, passando sobre a cicatriz umbilical). A circunferência do quadril considera o maior diâmetro da região trocantérica.

A partir dessas medidas foram calculados alguns parâmetros que podem indicar riscos para as pacientes.

Para a avaliação de possíveis riscos de doenças cardiológicas associados a SOP, foi utilizada a Relação Cintura e Quadril (RCQ), dada pela fórmula (RCQ = Circunferência da cintura(cm)/Circunferência do quadril(cm)). Resultados superiores a 0,8 para mulheres indicam alto risco para doenças cardiovasculares (LIMA *et al.*,2016).

Já a relação Cintura-estatura (RCE) é dada pela fórmula (RCE= circunferência da cintura(cm)/Estatura(cm)) e o ponto de corte para risco de doenças cardiovasculares em mulheres é 0,53 (PEREIRA *et al.*, 2011).

O índice de conicidade (IC) é dado pela fórmula ( $IC = \text{circunferência da cintura (m)} / 0,109 \sqrt{\text{Peso (Kg)} / \text{Estatura (m)}}$ ), e o ponto de corte para risco de doenças cardiovasculares em mulheres é 1,18 (PITANGA; LESSA, 2004).

O índice de avaliação do produto de acumulação lipídica (LAP) é dado pela equação ( $CC(\text{cm}) - 58$ ] x Triglicéridos (mmol)) e valores superiores a 34,5 se correlacionam com o aumento do risco cardiovascular (ABRUZESSE *et al.*, 2016).

## **2.4.5. Composição Corporal**

### **2.4.5.1. Bioimpedância**

Para a análise de bioimpedância, foi utilizado o aparelho *InBody S10* da Marca *BiospaceCo, Ltda* que possui um sistema de eletrodos tetra polar, com sistema de medição segmentar direito.

Para a realização do exame, as pacientes deveriam se posicionar em decúbito dorsal, com os membros superiores estendidos junto ao corpo e os inferiores em extensão, mantendo uma distância aproximada de 15 a 20 cm entre os mesmos. Os eletrodos foram posicionados nos dedos médios e polegares de ambas as mãos e no tornozelo de ambas as pernas.

É importante ressaltar que a paciente não poderia ser portadora de Marca-Passo e não deveria, no momento do exame, usar acessórios ou vestimentas que contenham metal, aço ou outros materiais condutores, para evitar interferências. A realização do exame em período menstrual também poderia ocasionar resultados alterados.

Os dados fornecidos pelo exame de bioimpedância, utilizados neste trabalho, foram: massa livre de gordura (kg), massa gorda (kg), massa celular corporal (kg), massa muscular esquelética (kg), percentual de gordura (%), área de gordura visceral (cm<sup>2</sup>), conteúdo mineral ósseo (kg), massa magra braços direito e esquerdo, tronco e pernas esquerda e direita (kg).

### **2.4.5.2. Índices de avaliação de resistência insulínica**

Para as pacientes que possuíam os dados bioquímicos (44 pacientes com SOP e 34 pacientes controles), foi realizada a avaliação da Resistência Insulínica. Nessa, foram analisados exames séricos de glicemia de jejum e de insulina basal e utilizados tais dados para a realização dos índices de avaliação de modelo de homeostase IR e Beta (HOMA-IR e HOMA BcC), calculados pelas respectivas fórmulas ( $HOMA\ IR = \text{insulina basal (mU/L)} \times \text{Glicemia de Jejum (mmol/L)} / 22,5$ ) e ( $HOMA\ BcC = 20 \times \text{insulina basal (mU/L)} / \text{Glicemia de}$

Jejum (mmol/L) - 3,5) (MATTHEWS *et al.*, 1985). Os valores de corte do índice HOMA-IR para resistência insulínica são  $>2,71$  e para o índice HOMA BcCentre 167-175 (VIEIRA *et al.*, 2007; VASQUESet *al.*, 2008).

Foi realizado ainda índice de sensibilidade à insulina (Quick), calculado por meio da equação ( $Quick = 1 / LOG \text{ Insulina} + LOG \text{ Glicemia}$ ). O ponto de corte para resistência à insulina é  $< 0,34$  (KATZ; NAMB; MATHER, 2000; VIEIRA *et al.*, 2007).

## **2.4.6. Análises Moleculares**

### **2.4.6.1. Coleta de sangue e separação dos leucócitos**

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

A obtenção dos leucócitos foi realizada a partir da lavagem desse sangue. Após homogeneizado, o sangue periférico das pacientes foi colocado em tubo de 50 mL, completando o volume com Tampão de Eluição - TE 10:1 (Tris HCl, 1 mM EDTA 0,5 mM 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. Após, 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 completar cobertura do *pellet* de leucócitos e garantir a conservação da amostra. Logo após, *ospellets* foram armazenados em tubos de 50 mL, no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração do DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2007 com adaptações).

### **2.4.6.2. Extração de DNA genômico**

O DNA dos leucócitos de sangue periférico dos grupos caso e de controle foi extraído a partir da técnica de fenol: clorofórmio: isoamílico, segundo Sambrook e colaboradores (1989), com modificações e armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  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 15 mL 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.

**Quadro4** - Reagentes usados no preparo da Solução C. Uberaba-MG/2018.

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

Fonte: Autora, 2018

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, transferidas para um novo tubo de 15mL e adicionado 1000µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Novamente, as amostras foram agitadas, por 15 minutos, e centrifugadas a 3500rpm, por mais 15 minutos.

Após a segunda centrifugação, foi coletada novamente a fase superior de cada amostra, em outro tubo de 15mL, e colocado 40µL de Acetato de Sódio 0,2M e 1mL de etanol 100% gelado. Os tubos foram invertidos cuidadosamente para a precipitação do DNA que, em seguida, 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 ressuspensas em TE 20:1 e colocadas em eluição, em banho-maria a 37°C, por cerca de 48 horas.

#### 2.4.6.3. 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/µL. 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 o momento de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

#### 2.4.6.4. Análise dos polimorfismos de deleção

A análise dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada pela técnica de PCR multiplex (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996). Como controle interno da reação, foi utilizada a sequência do gene *CYP1A1*. O Quadro 5 apresenta as sequências sense e antisense dos *Primers* utilizados para a reação de PCR Multiplex dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP1A1*.

**Quadro 5** - Sequência dos *Primers* dos Polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e controle de reação *CYP1A1*. Uberaba-MG/2018.

<b>Genes</b>	<b><i>Primers</i> (5'-3')</b>
<i>GSTT1</i>	Sense: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' Antisense: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'
<i>GSTM1</i>	Sense: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C -3' Antisense: 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G -3'
<i>CYP1A1</i>	Sense: 5'-GAA CTG CCA CTT CAG C TG TCT -3' Antisense: 5'- CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC -3'

Fonte: Autora, 2018

Para a reação da PCR, foi utilizado um volume final de 30 µl, contendo 0,2 mM de dNTP, 1x Tampão de PCR, (35mM Tris-HCl (pH9.0); 25 mM KCl; 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 pmol de cada *Primer*, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 100 ng de DNA genômico.

A amplificação por PCR consistiu de uma etapa inicial de 94 °C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C, por 2 minutos, anelamento a 59 ° C, por 1 minuto, e extensão a 72° C, durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose de 1,5% a 80 volts, por cerca de 40 minutos, e foram corados por GelRed™. Para a realização da análise do gel, foi utilizada a luz ultravioleta acoplada a um computador. A presença do gene *GSTT1* foi caracterizada pela presença de um fragmento amplificado de 480 pares de base (pb), *GSTM1* com 219 pb e o controle interno de reação (*CYP1A1*) com 312 pb.

#### 2.4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada, utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences*(SPSS), versão 24.

Para os dados quantitativos, foi utilizada estatística descritiva, por meio de frequência (absoluta e relativa), e tendência central e dispersão (média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil).

A fim de verificar a normalidade dos dados aplicados, foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para os dados normais, foi utilizado o teste de T-Student para comparar os dados dos grupos caso e controle.

Para os dados não normais, foi utilizado o teste Wilcoxon de Mann Whitney para comparar os dados dos grupos caso e controle.

Com relação às variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado para comparar os dados dos grupos caso e controle.

O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para determinar os efeitos dos fatores de risco (tabagismo, etilismo e presença dos polimorfismos) na SOP. Para isso, foi analisado 106 pacientes com SOP e 106 controles. Os resultados da análise de regressão logística foram apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Para todas as análises realizadas o nível de significância considerado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Fatores de risco e consequências clínicas

O grupo da SOP apresentou idade média de 26 anos ( $\pm 7,54$ ). Já o grupo controle apresentou idade média de 31 anos ( $\pm 9,25$ ).

A Tabela 1 apresenta os fatores de risco: Tabagismo, Etilismo e Histórico Familiar de SOP. Os dados mostram que 13,8% das participantes da pesquisa possuem o hábito tabagista, sendo mais frequente no grupo controle. Quanto ao hábito etilista, observou-se que 27,8 das mulheres participantes da pesquisa apresentavam este hábito, porém não foi evidenciado diferenças significativas entre os grupos. Observando o histórico familiar de SOP, 29,3% das participantes apresentavam familiares com SOP, existindo diferença significativa entre os grupos, onde as pacientes apresentaram maior número de familiares com SOP (67,6%) comparado ao grupo controle (32,4%).

**Tabela 1** - Distribuição dos fatores de risco (tabagismo, etilismo e histórico familiar), em pacientes com SOP (Caso) e controle. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Total	Caso	Controle	P
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Tabagismo</b>	n=232	n=113	n=119	
Tabagista	32(13,8)	7(21,9)	25(78,1)	<b>&lt;0,001</b>
Não faz uso	200(86,2)	106(53,0)	94(47,0)	
<b>Etilismo</b>	n=234	n=115	n=119	
Etilista	65 (27,8)	27(41,5)	38(58,5)	0,149
Não faz uso	169(72,2)	88(52,1)	81(47,9)	
<b>Histórico familiar SOP</b>	n=232	n=113	n=119	
Possui	68 (29,3)	46(67,6)	22(32,4)	<b>&lt;0,001</b>
Não possui	164 (70,7)	67(40,9)	97(59,1)	

**Legenda:** P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. Fonte: Autora, 2018

A Tabela 2 apresenta os dados referentes às consequências clínicas da SOP, como: ausência de gestação, irregularidades menstruais, fatores associados à infertilidade, doenças cardiovasculares e quadro clínico de hiperandrogenismo (presença de hirsutismo, acne, oleosidade, queda de cabelo). A presença de gestação foi mais frequente entre as mulheres do grupo controle (73,6%). Considerando a presença de irregularidade menstrual, observamos que 21,7% das participantes da pesquisa apresentavam o quadro. Comparando entre os grupos, houve diferença significativa, onde o grupo de pacientes SOP apresentou maior número de participantes com irregularidade menstrual (88%), comparado ao grupo controle (12%). Quanto à presença do quadro de hirsutismo, 28,3% das participantes da pesquisa apresentaram. Houve diferença entre os grupos, onde as pacientes SOP apresentaram um número maior de mulheres com o quadro (90,8%) em relação ao grupo controle (9,2). Quanto à presença de acne, 44,8% das participantes apresentaram o quadro. Destas, o grupo de mulheres com SOP apresentou um número maior apresentando o quadro (68%) em relação ao grupo controle (32%), apresentando diferença significativa entre os grupos. Quanto à presença de oleosidade de pele e cabelo, 60,4% das participantes apresentaram. Foi observado um número maior de participantes que apresentaram oleosidade no grupo de portadoras de SOP (59,7%) comparado ao grupo controle (40,3%), apresentando diferença significativa entre os grupos. Quanto a variável queda de cabelo, observou-se que 48% das participantes da pesquisa apresentaram. Nesta variável, houve diferença significativa entre os grupos, onde houve um número maior de participantes do grupo de mulheres com SOP (62,7%) em relação ao grupo controle (37,3%). Em relação à presença de doenças cardiovasculares, 10,2% das pacientes apresentaram essas patologias. Comparando-se os grupos, não houve diferenças significativas. Em relação ao uso de medicações hormonais, não descrito na tabela, observou-se que 65 (87,8%) das mulheres com a SOP faziam uso de algum tipo de medicação hormonal, enquanto no grupo controle, 48 (30,4%) das mulheres faziam uso dessas medicações, mostrando diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 2** - Distribuição das consequências clínicas (Gestação, Menstruação, Fatores associados a infertilidade, Doenças Cardiovasculares, Hirsutismo, Acne, Oleosidade e Queda de Cabelo), em pacientes com SOP e controle. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Total	Caso	Controle	P
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Gestações</b>	n=233	n=115	n=118	
Sim	91(39,1)	24(26,4)	67(73,6)	<b>&lt;0,001</b>
Não	142(60,9)	91(64,1)	51(35,9)	
<b>Irregularidades menstruais</b>	n=230	n=114	116	
Não	180(78,3)	70(38,9)	110(61,1)	<b>&lt;0,001</b>
Sim	50(21,7)	44(88,0)	6(12,0)	
<b>Fatores associados à infertilidade</b>	n=231	n=113	n=118	
Possui	14 (6,1)	11(78,6)	3(21,4)	<b>0,022</b>
Não possui	217 (93,9)	102(47,0)	115(53,0)	
<b>Doenças cardiovasculares</b>	n=232	n=113	n=119	
Possui	24(10,4)	14(58,3)	10(41,7)	0,319
Não possui	208(89,6)	99(47,6)	109(52,4)	
<b>Hirsutismo</b>	n=230	n=111	n=119	
Possui	65(28,3)	59(90,8)	6(9,2)	<b>&lt;0,001</b>
Não possui	165(71,7)	52(31,5)	113(68,5)	

Continua

				Conclusão
<b>Acne</b>	n=230	n=111	n=119	
Possui	103(44,8)	70(68,0)	33(32,0)	
				<b>&lt;0,001</b>
Não possui	127(55,2)	41(32,3)	86(67,7)	
<b>Oleosidade</b>	n=230	n=111	n=119	
Possui	139(60,4)	83(59,7)	56(40,3)	<b>&lt;0,001</b>
Não possui	91(39,6)	28(30,8)	63(69,2)	
<b>Queda Cabelo</b>	n=229	n=110	n=119	
Possui	110(48,0)	69(62,7)	41(37,3)	<b>&lt;0,001</b>
Não possui	119(52,0)	41(34,5)	78(65,5)	

---

**Legenda: P:**Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. Fonte: Autora, 2018

Em relação ao uso de medicações hormonais, 65 (87,8%) das mulheres com a SOP faziam uso de algum tipo de medicação hormonal, enquanto no grupo controle, 48 (30,4%) das mulheres faziam uso dessas medicações, mostrando diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ).

### 2.5.2. Dados Antropométricos

A Tabela 3 apresenta estatística descritiva com os valores médios ( $\pm$  desvio padrão), e mediana (os valores interquartis) do peso, altura e IMC de 108 pacientes com SOP e 115 controles. Apresenta ainda as variáveis de circunferência de cintura e quadril de 25 pacientes com SOP e 25 controles. Observou-se que na variável peso, o grupo de pacientes com SOP apresentou uma média de 79,64 kg e o grupo controle uma média de peso de 65 kg, apresentando diferença significativa entre os grupos. Quanto ao IMC, o grupo de pacientes

SOP apresentou uma média de IMC de 30,13, considerado como quadro de obesidade, e o grupo controle apresentou uma média de 24,8, considerado como peso normal/eutrófico, diferindo estatisticamente entre os grupos. Os dados de altura, cintura e quadril, apresentaram respectivamente, as médias para o grupo de mulheres com SOP de 1,63 metros, 81,24 cm e 98,96 cm e o grupo controle de 1,62 metros, 85,28 cm e 96,98 cm. Em ambas as variáveis não observou-se diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 3** - Classificação do índice de massa corporal (IMC), das pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Caso (n=108)		Controle (n=115)		P
	Média±DP	Mediana (IIQ)	Média±DP	Mediana (IIQ)	
Peso (Kg)	79,64±21,70	77,20(62,50;92,00)	66,95±14,73	65,00(57,00;74,60)	<0,001
Altura (m)	1,63±0,67	1,63(1,59;1,67)	1,62±0,06	1,62(1,58;1,65)	0,160
IMC (kg/m)	30,13±7,89	29,80(23,46;34,37)	25,48±5,07	24,80(21,60;28,34)	<0,001
Cintura (cm)	87,24±15,25	90,0(74,9;99,5)	85,28±15,48	85,0(72,50;96,0)	0,654
Quadril (cm)	98,96±10,43	98,0 (90,0;107,5)	96,98±12,94	95,0 (87,0;103,0)	0,341

**Legenda:** P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. DP: Desvio Padrão IIQ: Intervalo Interquartil. Fonte: Autora, 2018.

### 2.5.2.1. Índices de avaliação de riscos de doenças cardiológicas

A Tabela 4 ilustra os valores da Relação Cintura e Quadril (RCQ) e Cintura e Estatura (RCE) e o índice de conicidade (IC), de 25 pacientes com SOP e 25 controles. O índice LAP foi calculado para 22 pacientes com SOP e 22 mulheres controles. Os valores destas variáveis não diferiram significativamente entre os grupos.

**Tabela 4** - Relação Cintura e Quadril (RCQ), Relação Cintura e Estatura (RCE), índice de conicidade (IC) e índice de avaliação do produto de acumulação lipídica (LAP) das pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Caso RCE/RCQ/IC (n=25)LAP (n=22)		Controle RCE/RCQ/IC (n=25)LAP (n=22)		P
	Média±DP	Mediana (IIQ)	Média±DP	Mediana (IIQ)	
RCE	0,53±0,10	0,52(0,45;0,59)	0,54±0,10	0,55(0,45;0,60)	0,990
RCQ	0,87±0,07	0,87(0,81;0,93)	0,88±0,10	0,87(0,81;0,94)	0,132
IC	1,20±0,11	1,20(1,12;1,31)	1,21±0,13	1,19(1,25;1,28)	0,849
LAP	31,02±23,57	23,32(12,98;44,86)	51,26±46,23	39,61(21,68;69,22)	0,071

**Legenda:**P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. **DP:** Desvio Padrão **IIQ:** Intervalo Interquartil. Fonte: Autora, 2018.

### 2.5.3. Composição Corporal

#### 2.5.3.1. Bioimpedância

O exame de bioimpedância foi realizado em 50 mulheres, sendo 25 mulheres com SOP e 25 controles. A Tabela 5 mostra todos os parâmetros avaliados nesse exame, onde não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em ambas as variáveis.

**Tabela 5** - Distribuição dos dados resultantes do exame bioimpedância, em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Caso (n=25)		Controle(n=25)		P
	Média±DP	Mediana (IIQ)	Média±DP	Mediana (IIQ)	
Massa Gorda(kg)	23,20±9,28	26,60(17,05;29,40)	22,20±11,40	19,70(14,25;27,95)	0,735
Percentual de Gordura (%)	31,73±9,25	34,20(28,20;37,95)	30,80±9,19	25,00(23,25;27,20)	0,725
Área de Gordura Visceral (cm <sup>2</sup> )	84,32±37,78	95,00(55,35;110,30)	77,88±46,96	57,40(39,60;111,05)	0,596

Continua

					Conclusão
Massa Livre de Gordura(kg)	47,52±7,98	46,60(42,35;50,75)	46,20±4,70	45,00(42,25;49,20)	0,594
Massa Celular Corporal(kg)	30,83±5,20	29,70(27,45;32,85)	30,34±3,50	29,60(27,75;32,05)	0,648
Massa Muscular Esquelética(kg)	26,06±4,72	25,10(23,00;27,85)	25,44±2,77	25,00(23,25;27,20)	0,677
Conteúdo Mineral Ósseo(kg)	2,98±0,50	2,93(2,65;3,19)	2,81±0,31	2,77(2,62;3,05)	0,256
Massa Magra Braço Direito(kg)	2,02±0,51	2,01(1,67;2,26)	2,10±0,60	1,95(1,75;2,19)	0,992
Massa Magra Braço Esquerdo(kg)	1,98±0,50	1,98(1,62;2,17)	1,91±0,35	1,90(1,67;2,09)	0,580
Massa Magra Tronco(kg)	18,38±3,07	18,10(16,45;19,75)	17,63±3,92	18,10(16,30;19,25)	0,786
Massa Magra Perna Direita(kg)	8,39±1,54	8,24(7,45;9,20)	8,11±1,24	8,19(7,40;8,84)	0,484
Massa Magra Perna Esquerda(kg)	8,33±1,50	8,06(7,46;8,91)	8,06±0,86	7,85(7,37;8,61)	0,497

**Legenda:**P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. **DP:** Desvio Padrão **IIQ:** Intervalo Interquartil. Fonte: Autora, 2018.

#### 2.5.4. Índices de avaliação de Resistência Insulínica

A Tabela 6 ilustra os índices de avaliação de Resistência insulínica (RI) calculados, ao utilizar valores de insulina e glicose. Os índices HOMA-IR, HOMA BcC e Quick foram realizados em 44 mulheres com SOP e 34 controles, conforme a disponibilidade dos exames necessários. A análise do índice HOMA-IR mostrou que o grupo de mulheres com SOP apresentou uma média de 5,13, considerado resistente a insulina, e o grupo controle uma média de 2,64, considerado como normal, houve diferença estatística significativa entre os grupos. Considerando o índice HOMA BcC, observou-se, no grupo de mulheres com SOP o valor médio de 297,96, considerado resistente insulínico, e o grupo controle uma média de 161,47, considerado dentro dos parâmetros normais, comparando-se os grupos, houve diferença significativa entre os grupos. Observando o Índice Quick, as mulheres com SOP

apresentaram uma média de 0,32 considerado pelos parâmetros como normal, e grupo controle uma média de 0,33, também considerado normal, porém, estatisticamente, houve diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 6** - Distribuição dos valores obtidos pelos Índices de Resistência Insulínica (HOMA-IR, HOMA BcC e Quick) em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Caso (n=44)		Controle (n=34)		P
	Média±DP	Mediana (IIQ)	Média±DP	Mediana (IIQ)	
Índice Homa	5,13±4,19	3,89(1,90;7,46)	2,81±1,44	2,64(1,73;3,63)	0,033
Índice HomaBcC	297,96±214,75	217,85(126,64;459,82)	184,53±131,03	161,47(104,06;211,61)	0,025
Índice Quick	0,32±0,53	0,32(0,29;0,35)	0,34±0,33	0,33(0,31;0,35)	0,047

**Legenda:**P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. **DP:** Desvio Padrão **IIQ:** Intervalo Interquartil. Fonte: Autora, 2018.

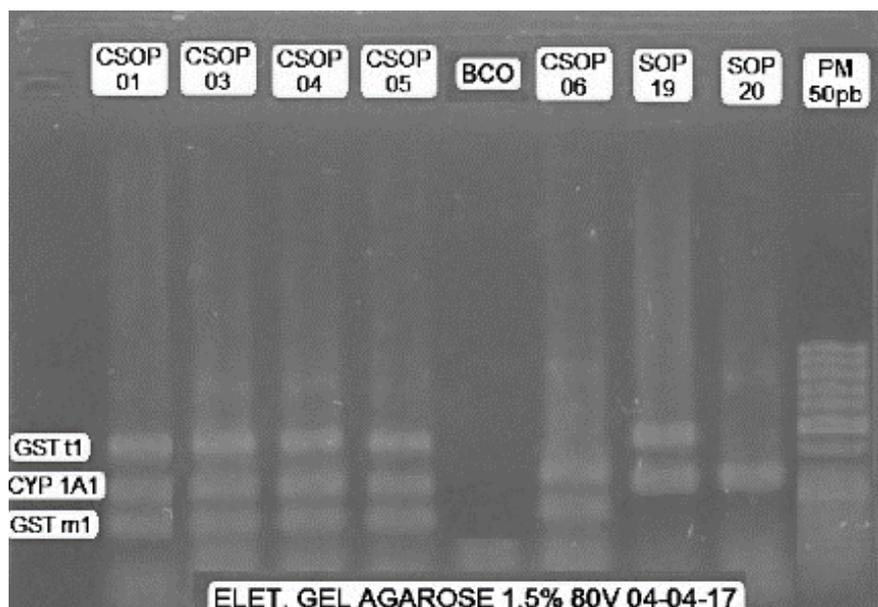
## 2.5.5. Dados Moleculares

### 2.5.5.1. Análise dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1*/*GSTM1*

Para os polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, foram analisadas 110 mulheres com SOP e 109 controles. As amostras amplificadas foram observadas em gel de agarose 1,5%, sendo possível a observação da banda de 480 pb, correspondente ao gene *GSTT1*, a banda de 312 pb, correspondente ao gene controle da reação *CYP1A1*, e a banda de 219 pb, correspondente ao gene *GSTM1*.

Na Figura 4, pode-se observar as amostras amplificadas em gel de agarose 1,5%, onde as amostras 01, 03, 04 e 05 possuem a presença dos genes *GSTT1* e *GSTM1*. Na amostra 06, observa-se a ausência do gene *GSTT1* e a presença do gene *GSTM1*. Na amostra 19, observa-se a presença do gene *GSTT1* e a ausência do gene *GSTM1*. Na amostra 20, observa-se a ausência de ambos os genes *GSTT1* e *GSTM1*. Ambas as amostras apresentam o gene *CYP1A1* como controle de reação.

**Figura 4-** Gel de agarose 1,5 % com os produtos das ampliações dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. O amplificado de 480 pb é correspondente ao gene *GSTT1*, o amplificado 312 pb é correspondente ao gene *CYP1A1* (controle de reação) e o amplificado de 219 pb correspondente ao gene *GSTM1*.(CSOP1, CSOP03, CSOP04 e CSOP05) *GSTT1* positivo e *GSTM1* positivo; (CSOP06) *GSTT1* negativo e *GSTM1* positivo; (SOP 19) *GSTT1* positivo e *GSTM1* negativo; (SOP 20) *GSTT1* negativo e *GSTM1* negativo; (BCO) controle negativo e (PM 50 pb): marcador de 50 pares de bases.



Na Tabela 7, pode-se observar a frequência dos polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1*e*GSTM1*, nas mulheres com SOP e Controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

**Tabela 7** - Distribuição genotípica dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTMI*, em pacientes com SOP e controles. Uberaba-MG/2018.

Variáveis	Total n (%)	Caso n(%)	Controle n (%)	P
<i>GSTT1</i>	219 (100)	110(50,2)	109(49,8)	
[+]	162 (100)	83(51,2)	79(48,8)	0,616
[-]	57 (100)	27(47,4)	30(52,6)	
<i>GSTMI</i>	219 (100)	110(50,2)	109(49,8)	
[+]	129(100)	60(46,5)	69(53,5)	0,188
[-]	90(100)	50(55,6)	40(44,4)	

**Legenda:** P: Valores de  $p \leq 0,05$  são significantes. [+]: Presença do gene [-]: Deleção do Gene. Fonte: Autora, 2018.

### 2.5.6. Análise Multivariada

A Tabela 8 mostra os resultados do teste de regressão logística múltipla, realizado com dados de 106 mulheres com SOP e 106 controles. Foram utilizados os fatores de risco para SOP (hábito tabagista e etilista e histórico de SOP familiar) e os polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTMI*.

Nessa análise, o hábito tabagista foi mais frequente no grupo controle (OR = 0,22; IC 95% - 0,87-0,57;  $p = 0,002$ ) enquanto que a presença do histórico de SOP familiar (OR = 2,96; IC 95% - 1,54-5,68;  $p = 0,001$ ) foi mais frequente nas mulheres com SOP, observando diferença significativa entre os grupos. Nas variáveis de etilismo, e os polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTMI*, não apresentaram diferenças estatísticas significantes comparando-se os grupos.

**Tabela 8-** Distribuição de fatores de risco para SOP e os polimorfismos de deleção estudados do grupo caso e do grupo controle. Uberaba-MG/2018.

Variáveis Analisadas	Paciente n (%)	Controle n (%)	O.R (IC-95%)	p
<b>Fatores de Risco</b>				
<b>Tabagismo</b>				
Sim	7(6,6)	24(22,6)		
Não	99(93,4)	82(77,4)	0,22 (0,87-0,57)	<b>0,002</b>
<b>Etilismo</b>				
Sim	25(23,6)	33(31,1)		
Não	81(79,4)	73(68,9)	0,85 (0,44-1,65)	0,627
<b>Histórico familiar SOP</b>				
Sim	46(40,6)	21(19,8)		
Não	63(59,4)	85(80,2)	2,96 (1,54-5,68)	<b>0,001</b>
<b>Polimorfismos de Deleção</b>				
<b><i>GSTT1</i></b>				
[+]	79(74,5)	78(73,6)		
[-]	27(25,5)	28(26,4)	0,89 (0,46-1,72)	0,735
<b><i>GSTM1</i></b>				
[+]	59(55,7)	68(64,2)		
[-]	47(44,3)	38(35,8)	1,21 (0,67-2,19)	0,611

**Legenda:** [+]: Presença do gene, [-]: Deleção do Gene **O.D:** oddsratio, **IC:** Intervalo de Confiança. Fonte: Autora, 2018.

## DISCUSSÃO

Este estudo identificou fatores de risco, consequências clínicas, dados antropométricos, composição corporal, e polimorfismos de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, em pacientes com SOP, comparando a uma população controle. Conforme evidências da literatura, a SOP é considerada uma doença multifatorial com variáveis endócrinas, metabólicas, genéticas e ambientais com diversas consequências clínicas (ESCOBAR-MORREALE, 2018).

No presente estudo todas as pacientes estavam em idade reprodutiva, com faixa etária entre 15 e 44 anos. Esse resultado está de acordo com a literatura, visto que a SOP é uma doença frequentemente relatada como sendo a endocrinopatia mais comum em mulheres nesta faixa etária (MOURA *et al.*, 2011).

Também foi observado que as variáveis, ausência de gestação, fatores associados à infertilidade e irregularidade menstrual, diferiram entre os grupos. As características clínicas do hiperandrogenismo (presença de acne, oleosidade de pele e cabelo e hirsutismo) também diferiram entre os grupos, com uma maior frequência no grupo de pacientes. Esses dados estão em conformidade com a literatura que mostram diversos estudos que definem a síndrome com uma combinação de sinais e sintomas do excesso de andrógenos, que resultam nas características clínicas do hiperandrogenismo e em disfunção ovariana, que pode caracterizar irregularidades menstruais e levar à anovulação, o que acentua assim os fatores associados à infertilidade e à ausência de gestações (MELO *et al.*, 2015; LINZNEVA *et al.*, 2016; ESCOBAR-MORREALE, 2018; PATEL, 2018).

Cabe ainda salientar que mulheres com SOP apresentam quadros de infertilidade, caracterizados pela ocorrência de ovulações esparsas (BARBIERE *et al.*, 2010). É estimado ainda que 40% das gravidezes em mulheres com SOP resultam em aborto espontâneo (PLUCHINO *et al.*, 2014).

Em relação ao uso de medicamentos hormonais, esse foi também mais frequente nas mulheres com SOP. O tratamento da SOP deve ser baseado nos sintomas, na prevenção e no controle de alterações metabólicas e na redução de fatores de risco cardiovasculares, relacionados com resistência insulínica, quando houver. Existem várias condutas terapêuticas, algumas constituem opções para inúmeras manifestações. Vários medicamentos podem ser utilizados no tratamento da SOP, dentre eles, os anticoncepcionais orais. Entretanto, a literatura demonstra que os agentes sensibilizadores da ação da insulina estão substituindo o uso de anticoncepcionais orais, porque esses podem piorar a resistência à insulina, induzir intolerância à glicose, aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2,

dentre outros (BRASIL, 2013). Os dados de medicação hormonal foram mais frequentes em mulheres com SOP em relação as controles, evidenciando que o uso de anticoncepcionais, nesse caso, ainda parece ser o tratamento mais utilizado para doença.

No presente trabalho, o peso e o IMC aumentados foram mais frequentes entre as pacientes. O quadro de obesidade foi frequentemente observado em SOP e afeta mais da metade das pacientes. Esse resultado também está de acordo com o trabalho de Ates e colaboradores (2017), que avaliou adolescentes na Turquia e mostrou que as pacientes com SOP tiveram um aumento do IMC, o que pode contribuir para o desenvolvimento de anormalidades metabólicas. Uma meta análise realizada por Kataoka e colaboradores (2017), analisou 14 artigos que avaliaram as intervenções nutricionais em SOP. Desses estudos, 13 mostraram uma associação entre o aumento do IMC com SOP, o que também está em conformidade com os nossos resultados.

Em relação às doenças cardiovasculares, não foi evidenciada uma frequência aumentada nas pacientes, o que pode ser devido à idade das mesmas e ao período investigado, pois os dados foram coletados após o diagnóstico da síndrome. Entretanto, a avaliação entre parâmetros das relações Cintura e Quadril (RCQ), Relação Cintura e estatura (RCE), índice de avaliação do produto de acumulação lipídica (LAP), índice de conicidade (IC), demonstrou não haver diferenças, quando comparados grupo caso e controles.

O IMC é incapaz de distinguir a característica de deposição de gordura dos indivíduos, enquanto que as relações cintura e quadril e cintura e estatura são marcadores que parecem contribuir, favoravelmente, para a identificação de risco cardiovascular em mulheres com SOP, possibilitando às eutróficas e/ou magras (segundo IMC) serem analisadas quanto à composição corporal com mais propriedade para tal risco, e associar à clínica dessa síndrome para melhor conduta (HSIEH; MUTO, 2006).

Os dados obtidos a cerca do IMC do grupo caso reforçam os dados da literatura com a significativa relação entre a síndrome e quadros de obesidade. As taxas de mulheres portadoras que possuem obesidade podem chegar até 50%, indicando que as consequências clínicas da SOP favorecem a ocorrência de irregularidades metabólicas que agravam o quadro (GONÇALVES et al., 2018.)

Um estudo que analisou pacientes com SOP encontrou aumento dos índices RCQ e RCE, apenas em mulheres obesas, concluindo que elas têm maior risco cardiovascular (SOUSA et al, 2013).

O LAP é um índice de risco cardiovascular emergente que se baseia no produto da circunferência abdominal (CA), pelo valor de triglicérides (TGL) em jejum. Tem se revelado um marcador confiável para doença cardiovascular em adultos, e tem sido utilizado em pacientes com SOP (COSTA *et al.*, 2010a).

Nossos resultados não estão de acordo com um estudo brasileiro realizado no Rio Grande do Norte que analisou 238 pacientes com SOP, e evidenciou que as mesmas apresentavam maior risco de doenças cardiovasculares, por meio da avaliação pelo índice LAP (COSTA *et al.*, 2010a).

O índice de conicidade (IC), um indicador de obesidade abdominal, tem sido alvo de estudo, com o intuito de avaliar a sua possível relação com variáveis consideradas como de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sobre isso, os dados do nosso estudo são concordantes com os estudos realizados por Costa e colaboradores, pois não mostraram associação desse índice com a SOP (COSTA *et al.*, 2010b).

As variáveis da composição corporal, obtidas por meio do exame de bioimpedância, não apresentaram diferenças entre os dois grupos analisados, o que está em conformidade com o trabalho de Aydin e colaboradores, realizado em 2013, que analisou 28 pacientes e 28 controles, uma casuística muito semelhante ao nosso estudo, e não encontrou diferenças dos parâmetros nos grupos. Também, estão em conformidade com um estudo que analisou 13 estudantes gregas e não evidenciou diferenças entre os grupos (GERONIKOLOU *et al.*, 2017).

Uma das limitações do nosso estudo em relação à análise de bioimpedância, é o pequeno número amostral; entretanto, na literatura os estudos que realizaram tal análise foram feitos com amostra semelhante ou menor que a utilizada para esse parâmetro. Outra limitação deve-se ao fato de que algumas pacientes iniciam imediatamente o tratamento para SOP com anticoncepcionais orais e essa medicação pode alterar alguns dados na composição corporal das pacientes. Em nossa casuística, o ganho de massa gordurosa também poderia ter sido controlado por meio do uso de medicação hormonal, nas pacientes com SOP, pois cerca de 76%, das 25 pacientes portadoras da síndrome, já faziam o uso do medicamento antes da realização do exame de bioimpedância.

Neste estudo, os índices de avaliação Resistência Insulínica calculados, utilizando valores de insulina e de glicose HOMA-IR, HOMA BcC E Quick, apresentaram diferenças estatísticas significativas, comparando-se os grupos, a saber: nos índices HOMA-IR e HOMA BcC tanto o grupo caso quanto o grupo controle apresentaram valores de média acima do

ponto de corte para resistência insulínica (ponto de corte HOMA-IR>2,71; ponto de corte HOMA BcC entre 167-175), porém, o grupo controle possui uma média bem próxima ao corte estimado em ambos os índices. No índice Quick, ambos os grupos se encontram fora do ponto de corte de normalidade, no entanto, o grupo controle se encontra próximo ao ponto considerado normal (ponto de corte < 0,34).

Foi realizado um estudo para verificar a associação entre gordura e massa magra com disfunção metabólica e SOP. Nesse, foi observada maior relação cintura-quadril, gordura corporal, IMC, níveis de insulina em jejum e valores de HOMA-IR e HOMA-Beta em SOP (EZEH *et al.*, 2014). Também, em um estudo de perfis antropométricos em pacientes com SOP, foi constatado que a SOP estão associadas a um perfil antropométrico e metabólico menos favorável (GRAFF *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos que utilizaram esse método de avaliação relataram um aumento da secreção de insulina em pacientes com SOP, quando comparadas com controles saudáveis. Uma hipótese para explicar essa alteração foi que o aumento da insulina seria uma forma compensatória de manter a glicemia normal devido à RI, frequentemente observada nessas pacientes (VIEIRA *et al.*, 2007)

No presente estudo não foi encontrada a associação da deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* com SOP. Há estudos que mostram uma diminuição da atividade enzimática maior em pacientes com SOP, quando comparada a uma população controle, relatando ainda um aumento do estresse oxidativo em pacientes com essa função diminuída. Portanto, os polimorfismos de deleção desses genes podem estar diretamente associados a um aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente estar relacionados à SOP (KUDORGLU *et al.*, 2012). Em relação aos polimorfismos de deleção foi encontrado apenas um trabalho, realizado com populações indianas, associando as deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1* à SOP (BABU *et al.*, 2004).

Polimorfismos desses genes foram associados a diversos tipos de neoplasias, como: mama (OLIVEIRA *et al.*, 2014), bucal (STOSIC *et al.*, 2014), pulmão (SORESEN *et al.*, 2004), vesícula biliar (SAKAI *et al.*, 2016), além de doenças endócrinas como diabetes mellitus tipo 2 (AZAROVA *et al.*, 2018).

No presente estudo, o modelo de regressão logística múltipla evidenciou uma frequência aumentada do hábito tabagista no grupo controle. Tal comprovação não está de acordo com o estudo que avaliou o efeito do fumo em mulheres com SOP, concluindo que elas apresentavam risco aumentado para desenvolver disfunções endócrinas e outras doenças

associadas à síndrome(SUN *et al.*, 2010). Os hábitos tabagistas podem estar ligados a outros fatores como sociais, não apresentando uma relação tão próxima com a síndrome, porém é um fator de agravo para algumas condições como aumento de cortisol e da ansiedade no período de abstinência (MELO *et al.*, 2017).

Em nosso estudo também foi evidenciada uma frequência aumentada da recorrência familiar de SOP no grupo de estudo, estudos que apontaram a SOP como uma doença multifatorial com fatores genéticos na sua etiologia(AZZIZ, 2016). Estudos com gêmeos, inclusive, mostraram que mulheres com irmãs gêmeas monozigóticas portadoras de SOP mostraram ter o dobro do risco de desenvolver o distúrbio no momento em idade reprodutiva (VINK *et al.* 2006).

É possível observar que as diferenças identificadas pela análise estatística reforçam os dados da literatura para o histórico familiar da SOP, bem como a herança genética poligênica da síndrome (FREITAS *et al.*, 2016).

Os nossos resultados podem fornecer dados relevantes para a compreensão da etiologia e manejo da síndrome. Estudos adicionais na população brasileira são necessários para elucidar o papel dos polimorfismos na síndrome, bem como para estabelecer parâmetros da composição corporal nessa população.

## 2.7 CONCLUSÃO

Concluimos que fatores inerentes as mulheres portadoras de SOP e ao seu estilo de vida podem contribuir para uma maior prevalência da Síndrome dos Ovários Policísticos. Os dados como peso, IMC, resistência insulínica, além das consequências clínicas e histórico familiar de SOP, mostram uma relação direta com a Síndrome. Além disso nossos dados sugerem que não há uma relação entre a incidência de polimorfismos de deleção para os genes *GSTT1* e *GSTM1* e casos de SOP.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. **Cancerletters**, v. 107, n. 2, p. 229-233, 1996.

ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. 4ª edição. São Paulo – SP. 2016.

ABRUZZESE, G. A. et al. Lipid Accumulation Product (LAP) and Visceral Adiposity Index (VAI) as Markers of Insulin Resistance and Metabolic Associated Disturbances in Young Argentine Women with Polycystic Ovary Syndrome. **Hormone and Metabolic Research**, v. 26, n. 3, p. 136-143. 2015.

ALBALAWI, F. S. et al. rs 4889 polymorphism in *KISS1* gene, its effect on polycystic ovary syndrome development and anthropometric and hormonal parameters in Saudi women. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 50, 2018.

ALFAQIH, M. A. et al. Lower levels of serum adiponectin and the T allele of rs1501299 of ADIOQ gene are protective against Polycystic Ovarian Syndrome in Jordan, **Korean Journal of Family Medicine**, v. 39, p. 108-113, 2018.

ALI, A. T. Polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome, **Medvik: Českágynekologie**, v. 80, n. 4, p. 279-289, 2015.

ATES, S. et al. Clinical and metabolic characteristics of Turkish adolescents with polycystic ovary syndrome. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 38, n. 2, p. 236-240, 2018.

AYDIN, K. N. et al. Body Composition in Lean Women with Polycystic Ovary Syndrome: Effect of Ethinyl Estradiol and Drospirenone Combination. **Contraception**, v. 87, p. 358–362, 2013.

AZAROVA, J. et al. Glutathione S-transferase genes and the risk of type 2 diabetes mellitus: the role of sexual dimorphism, gene–gene and gene–smoking interactions in disease. **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 5, p. 398-407, 2018

AZZIZ, R. et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 2, p.456-488, 2009.

AZZIZ, R. et al. POSITION STATEMENT: Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4237-4245. 2006.

AZZIZ, R. New insights into the genetics of polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews: Endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 74-75, 2016.

BABU, K. A. et al. *CYP11A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genetic polymorphism is associated with susceptibility to polycystic ovaries in South Indian women. **Reprod Biomed Online**. v. 9, n 2, p. 194–200, 2004.

BAPTISTE, G. C.; BATTISTA, M. C.; TROTTIER, A.; BAILLARGEON, J. P. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 42-52, 2010.

BARBIERI, R. L.; EHRMANN, D. A. Clinical manifestations of polycystic ovary syndrome in adults. **UpToDate**, v. 17, 2014.

BEDNARSKA, S.; SIEJKA, A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 26, n. 2, p. 359-367, 2017.

BEHBOUDI-GANDEVANI, S. et al. The risk of metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Endocrinology**, v. 8, p. 169-184, 2018.

BRASIL. Portaria MS-SAS nº 1.318, de 25 de novembro de 2013. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Wilson. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2013.

BRITTO, E. P. MESQUITA, E. T. Bioimpedância Elétrica Aplicada à Insuficiência Cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro** v. 21, n. 3, p. 178-183, 2008.

CARMONA-RUIZ, I. O. et al. Proteómica y síndrome de ovariopoliquistico: ¿encontraremos aquí el eslabón perdido? Revisión de la bibliografía. **Ginecología y Obstetricia de México**. v. 83, n. 10, p. 83, p. 614-626, 2015

CONWAY, The polycystic ovary syndrome a position statement from the european society of endocrinology. **European Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 4, 2014.

COSTA, E. C. Avaliação do risco cardiovascular por meio do índice LAP em pacientes não obesas com síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 7, p. 630–635, 2010a.

COSTA, E. C. et al. Índices de obesidade central e fatores de risco cardiovascular na síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 5, p.633-638. 2010b.

COUTO, A. A. et al. Metabolic profiling of polycystic ovary syndrome reveals interactions with abdominal obesity. **International Journal of Obesity**, vol. 41, n. 9, p. 1331-1340. 2017

CRAIG, Z. R.; WANG, W.; FLAWS, J. A. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. **Reproduction**, v. 142, p. 633-646, 2011.

CZECZUGA-SEMENIUK, E. et al. The preliminary association study of *ADIPOQ*, *RBP4*, and *BCMO1* variants with polycystic ovary syndrome and with biochemical characteristics in a cohort of Polish women. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, p. 242-248, 2018.

DALLEL, M. et al. Differential association of *DENNDIA* genetic variants with polycystic ovary syndrome in Tunisian but not Bahraini Arab women. **Gene**, v. 647, p. 79-84, 2018.

DATTA, S. K. et al. Effect of *GSTM1* and *GSTT1* double deletion in the development of oxidative stress in diabetic nephropathy patients. **Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 47, p. 100-103, 2010.

DEDACHANJI, R. et al. PON1 promoter polymorphisms contribute to PCOS susceptibility and phenotypic outcomes in Indian women. **Gene**, v. 30, n. 661, p. 34-44, 2018.

DING, B. et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) and T1 (*GSTT1*) and endometriosis risk: a meta analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.183, p. 114–120, 2014.

EBRAHIMI, S. O.; REIISI, S.; BARJUI, S. P. Increased risk of polycystic ovary syndrome (PCOS) associated with CC genotype of *miR-146a* gene variation. **Gynecological Endocrinology**, p. 1-5, 2018.

ECHLUND, L. C.; USADI, R. S. Endocrine and reproductive effects of Polycystic Ovary Syndrome. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, n. 42, p. 55-65, 2015

ESCOBAR-MORREALE, H. F Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. **Nature Reviews: Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 270-284. 2018.

EZEH, U. et al. Association of fat to lean mass ratio with metabolic dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 29, n. 7, p. 1508-1517, 2014.

FAUSER, B. C. J. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. **FertilityandSterility**, v. 97, n. 1, 2012.

FERREIRA, J. A. S. Síndrome dos ovários policísticos: uma visão atual. **Femina**, v. 36, n. 8, 2008.

FERRIMAN, D.; GALLWEY, J. D. Clinical assessment of body hair growth in women. **JournalClinicalEndocrinologyMetabolism**, v. 21, p. 1440-1447, 1961.

FLORES, C. B.; FLORES, L.; COMIM, F. V. Hirsutismo: avaliação e princípios do tratamento. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 57, n. 3, p. 232-239, 2013.

FONTES-CARVALHO, R. et al. Diastolic dysfunction in the diabetic continuum: association with insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 4, 2015

- FOSBØL, M. Ø.; ZERAHN, B. Contemporary methods of body composition measurement. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v, 35, n. 2, p. 81-97, 2014
- FREITAS, L. A. R.; SANTOS, J. G.; GUIMARÃES, M. T. A.; SOUZA, J. H. K. Uso de metformina em mulheres obesas com síndrome do ovário policístico. **Revista de Ciências Médicas**, vol. 25, n. 2, p. 87-97, 2016.
- GERONIKOLOU, S. A.; BACOPOULOU, F.; COKKINOS, D. Bioimpedance Measurements in Adolescents with Polycystic Ovary Syndrome: A Pilot Study. **GeNeDis**, v. 987p. 291-299, 2017.
- GODDMAN, N. F. et al. American Association Of Clinical Endocrinologists, American College Of Endocrinology, And Androgen Excess And Pcos Society Disease State Clinical Review: Guide To The Best Practices In The Evaluation And Treatment Of Polycystic Ovary Syndrome - Part 2. **Endocrine Practice**, v. 21, n. 12, p. 1415-1426, 2015
- GONÇALVES, M. M.; FONSECA, H. P.; FUKUNAGA, E. T.; ALDRIGHI, J. M. Interferência dos hábitos nutricionais no perfil metabólico de mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Médicos**, v. 63, n. 1, p. 6-11, 2018.
- GRAFF, S. K. et al. Dietary Glycemic Index is Associated with Less Favorable Anthropometric and Metabolic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome Women with Different Phenotypes. **Fertility and Sterility**, v.100, p. 1081–1088, 2013.
- GROOT, P. C. M. et al. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 4, p. 495-500, 2011.
- HATAOKA, J. et al. Weight Management Interventions in Women with and without PCOS: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 2017.
- HAYEK, E. C. et al. Polycystic Ovarian Syndrome an updated overview. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 124, 2016.
- HAYES, M. G. et al. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. **Nature Communications**, v. 18, n. 6, 2015.
- HSIEH, S. D.; MUTO, T. Metabolic syndrome in Japanese men and women with special reference to the anthropometric criteria for the assessment of obesity: proposal to use the waist-to-height ratio. **Preventive Medicine**, v. 42 n. 2, p. 135-9, 2006
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HYDERALI, B. N.; MALA, K. Oxidative stress and cardiovascular complications in polycystic ovarian syndrome. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 191, p. 15-22, 2015

INBODY. **The precision body composition analyzer InBody**. Manual do usuário. Biospace Co. Ltd. 2010.

JOHAM, A. E. et al. Hypertension in Reproductive-Aged Women With Polycystic Ovary Syndrome and Association With Obesity. **American Journal of Hypertension**, v. 28, n. 7, 2015.

JONES, M. R.; GOODARZI, M. O. Genetic determinants of polycystic ovary syndrome: progress and future directions. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 1, 2016.

JOSHI, B. et al. A cross-sectional study of polycystic ovarian syndrome among adolescent and young girls in Mumbai, India. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 3, 2014

KATAOKA, J. *et al.* Weight management interventions in women with and without PCOS: a systematic review. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 996, 2017.

KATZ, A.; NAMBI, S. S.; MATHER, K. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI): A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 2402-2410.2000.

KHALIL, S. F.; MOHKTAR, M. S.; IBRAHIM, F. The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases. **Sensors**, v. 14, 2014.

KOCH, F. P. et al. Influence of class M1 glutathione s-transferase (*GSTM1*) polymorphism on *GSTM1* gene expression level and tumor size in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 46, p. 128-33, 2010.

KURDOGLU, K. et al. Oxidative status and its relation with insulin resistance in young non-obese women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 35, n. 3, p. 317-321, 2012.

KAYLE, U. G. et al. Bioelectrical impedance analysis-part I: review of principles and methods. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p.1226-1243, 2004.

LIMA, A. D. et al. A associação do índice de massa corpórea com a relação cintura/quadril no comprometimento da saúde de policiais militares no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 10, n. 59, p. 330-339, 2016.

LIU, A. L. et al. The role of FTO variants in the susceptibility of polycystic ovary syndrome and in vitro fertilization outcomes in Chinese women. **Gynecological Endocrinology**, v.20, p. 01-05, 2018.

LIZNEVA, D. et al. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 1, 2016.

LOHMAN, T. G.; SLAUGHTER, M. H. BOILEAU, R. A.; BUNT, J. LUSSIER, L. Bone Mineral Measurements and Their Relation to Body Density in Children, Youth and Adults. **Human Biology**, v. 56, n. 4, p. 667-679, 1984.

LOPEZ-JARAMILLO, P. et al. Consenso latino-americano de hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 3, p.205-225, 2014.

LUQUE-RAMÍREZ, M.; ESCOBAR-MORREALE, H. Adrenal Hyperandrogenism and Polycystic Ovary Syndrome. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p.5588-5602, 2016.

MAFFEIS, C. et al. Waist-to-Height Ratio, a Useful Index to identify High Metabolic risk in overweight children. **Journal of Pediatrics**, v. 152, p. 207-213, 2008.

MANI, H. et al. Diabetes and cardiovascular events in women with polycystic ovary syndrome; a 20 years retrospective cohort study. **Clinical Endocrinology**, v. 78, n. 6, 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 Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 55, n. 1, p. 6-15, 2011.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

MELO, A. S. et al. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. **Reproduction**, v. 150, p. 11-24, 2015.

MELO, B. K.; SOUZA, E. A.; SANTOS, J. S.; FERMOSELI, A. F. O. A relação da neurofisiologia do transtorno da ansiedade com a neurofisiologia do tabaco. **Ciências Biológicas e de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 51-60. 2017

MONTEIRO, A. B.; FILHO, J. F. Análise da composição corporal: Uma revisão de métodos. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 4, n. 1, p. 80-92, 2002.

MORAN, L. J.; NORMAN, R. J.; TEEDE, H. J. Metabolic risk in PCOS: phenotype and adiposity impact. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 136-143, 2015.

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

MURRI, M. et al. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 3 p. 268–288, 2013.

NASCIMENTO et al. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. **Lipids in Health and Disease**. v.14, n. 62, p. 1-8, 2015.

NIH – National Institute of Health. Evidence-based Methodology Workshop on PCOs. Workshop. 2012.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, 2007

OLIVEIRA, A. L. et al. *GSTT1*, *GSTM1*, and *GSTP1* polymorphisms as a prognostic factor in women with breast cancer. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 2521-2530, 2014.

ORIO, F. et al. Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk:anuptodate in the management of Polycystic Ovary Syndrome. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 207, p. 214-219, 2016

PATEL, S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2018. [Epub ahead of print]

PEREIRA, P. F. et al. Circunferência da cintura e relação cintura/estatura: úteis para identificar risco metabólico em adolescentes do sexo feminino? **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 3, p. 372-377. 2011.

PITANGA, F. J. G. LESSA, I. Sensibilidade e especificidade do índice de conicidade como discriminador do risco coronariano de adultos em Salvador, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.259-269, 2004.

PLUCHINO, N. et al. Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). **Hormones**, v. 13, n. 3, p. 314-322, 2014.

RAHIMI, Z. et al. The Association of *PPAR $\gamma$ Pro12Ala* and *C161T* Polymorphisms with Polycystic Ovary Syndrome and Their Influence on Lipid and Lipoprotein Profiles. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 12, n. 2, p. 147-151, 2018.

REIS, A. A. S. et al. As implicações do polimorfismo genético do gene GST na patogênese do Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 92-100, 2011.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM. Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 1, p. 19-25, 2004.

SAKAI, K. *CYP1A1, GSTM1, GSTT1* and *TP53* Polymorphisms and Risk of Gallbladder Cancer in Bolivians, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 17, n. 2, p. 781-784, 2016.

SAM, S. Adiposity and metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v.21, p.107–116, 2015.

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

SAN, L. A. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. **Journal of Endocrinology Investigation**. v. 33 n. 2, p. 77-82, 2010.

SANTANA L. F. et al. Tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 4, p. 201-209, 2008.

SANTOS, B. R.; LECKE, S. B.; SPRITZER, P. M. Apa-I polymorphism in *VDR* gene is related to metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a cross-sectional study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 01, p. 382018

SHAO, W.; ESPENSHADE, P. J. Expanding roles for SREBP in metabolism. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 414-419, 2012.

SHI, Y. et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1020-1025, 2012.

SIRMANS, S. M.; PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 1-13, 2013.

SØRENSEN, M. et al. Glutathione S-Transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 110, p. 219-224, 2004.

SOUSA, R. M. et al. Perfil metabólico em mulheres de diferentes índices de massa corporal com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 9, p. 413-420, 2013.

STEFANAKI, C. et al. Chronic stress and body composition disorders: implication for health and disease. **Hormones**, v, 17, p. 33-43, 2018.

STEIN, I. F.; LEVENTHAL, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 2, p. 181-191, 1935.

STOSIC, I. et al. Glutathione S-Transferase T1 and M1 Polymorphisms and Risk of Uterine Cervical Lesions in Women from Central Serbia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 7, p. 3201-3205, 2014

SUN, L. et al. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 33, p. 77-82, 2010.

THOMPSON, J. S. & THOMPSON, M. W. **Genética Médica**. Sétima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 525 pp.

VASQUES, A. C. J. et al. Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 01, p. 32-39, 2008.

VIEIRA, C. R. et al. Avaliação da função das células  $\beta$  pancreáticas através do modelo matemático de HOMA em portadoras de síndrome dos ovários policísticos: comparação entre obesas e não-obesas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 3, p. 141-146, 2007.

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

WANG, W. et al. Mono-(2-Ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1-10, 2012.

WHO – World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 9 de julho de 2018.

YILDIZ, B. O. Diagnosis of Hyperandrogenism: Clinical criteria. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 167-176, 2006.

ZHU, H. et al. Null Genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* and Endometriosis Risk: A Meta-Analysis of 25 Case-Control Studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106761, 2014.

## 4. ANEXOS

### 4.1. Parecer e extensão do Comitê de Ética da UFTM

1/4



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: Mariângela Torreglosa Ruiz  
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM  
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 22/11/2010  
PROTOCOLO 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 distúrbios metabólicos na mesma família; fenótipo em homens caracterizados 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 conhecida 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 Obstetrícia 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.



2/4

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP**  
**Parcecer 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 MgCl<sub>2</sub>, 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-EDTA-Borato), e identificados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo.

O Quadro 2 mostra a sequência 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	Sequências 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>HgII</i>
+936 C/T	F: 5' AAGGAAGAGGAGACTCTGGCG 3' R: 5' TATGTGGGCGGGTCTGTCTACAGGG 3'	<i>NlaIII</i>

**c. Discriminação alélica por PCR em tempo real**

A investigação do polimorfismo 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 Multiusuário 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).



3/4

**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 Toméglia 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, pipetador, 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.



4/4

**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 *TTGF* EM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO  
**PESQUISADORA RESPONSÁVEL:** Mariângela Torregosa 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 eletrolíse, 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 Obstetria 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

Outlook.com | Novo Responder Excluir Arquivar Lixo Eletrônico Limpar Mover para Categorias

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@pesqpg.uftm.edu.br](mailto:cep@pesqpg.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

© 2014 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)

## 5. APÊNDICES

### 5.1. 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 a doença denominada Síndrome dos Ovários Policísticos, está sendo convidada a participar do grupo de pacientes para o estudo intitulado “Polimorfismos Genéticos em Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”, uma doença ginecológica comum, que afeta mulheres em idade reprodutiva e é caracterizada por irregularidades menstruais e pela presença de cistos nos ovários.

Variantes genéticas podem estar associadas ao desenvolvimento dessa doença. Desse modo, avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como esse, 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 coleta 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 as informações que desejar 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 SpadottoBalarin – (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 dúvidas em relação a esse documento, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

## 5.2. - 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 o 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 pela presença de cistos nos ovários.

Variantes genéticas podem estar associadas ao desenvolvimento dessa doença. Desse modo, avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como esse, 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 coleta 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 desejar 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

**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 SpadottoBalarin – (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 poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

**5.3. Questionário para coleta de dados sóciodemográficos, clínico e exames bioquímicos.**



**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 HORMONAIIS**

**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
- Metrorrágia
- 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)