

MARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS PARA A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Michelle Daiane Antunes¹, Gléia Cristina Laverde Ricci², Luciana Conci Macedo³

RESUMO

Tendo em vista que a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é multifatorial e fatores genéticos e bioquímicos podem estar envolvidos, o presente estudo teve por objetivo realizar um levantamento bibliográfico dos principais marcadores moleculares e bioquímicos e os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da SOP. A Síndrome dos ovários policísticos (SOP) é reconhecida como um distúrbio endócrino comum entre 4 a 12% das mulheres em período reprodutivo, apontada como a principal causa de infertilidade feminina. Além dos sintomas como amenorréia (distúrbio menstrual) e produção excessiva de androgênios, a síndrome tem associação com obesidade, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. Existem hipóteses de que a SOP seja uma doença ovariana de caráter genético. Diversas vias bioquímicas têm sido envolvidas na patogênese da SOP, incluindo as que participam na biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides, obesidade e regulação de energia, hormônios de ação gonadal, relacionados à liberação e ação da insulina, e outros. Por possuir muitas variantes que ajudam para a etiologia da doença, a SOP, tem uma heterogeneidade genética e/ou heterogeneidade alélica.

Palavras-chave: SOP; insulino-resistência (IR); marcadores moleculares; marcadores bioquímicos; hiperandrogenismo.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MARKERS FOR POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

ABSTRACT

The Polycystic ovary syndrome (PCOS) is recognized as a common endocrine disorder among 4-12% of women in reproductive period and it is considered the main cause of female infertility. In addition to symptoms such as amenorrhea (menstrual disorder) and overproduction of androgens, the syndrome is associated with obesity, type II diabetes *mellitus*, dyslipidemia, insulin resistance and cardiovascular diseases. There are hypotheses that PCOS is a ovarian disease with genetic character. Several biochemical pathways have been involved in the pathogenesis of PCOS, including those involved in the biosynthesis and metabolism of steroid hormones, obesity and energy regulation, gonadal hormone action, related to the release and action of insulin, and others. By owning many variants that help to the etiology of the disease, PCOS has a genetic heterogeneity and/or allelic heterogeneity. Given that PCOS is multifactorial and genetic and biochemical factors may be involved, the aim of this study was to conduct a literature review about the major molecular and biochemical markers and the possible mechanisms involved in the development of PCOS.

Keywords: PCOS; insulin resistance (IR); molecular markers; biochemical markers; hyperandrogenism.

INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é reconhecida como um distúrbio endócrino comum entre 4 a 12% das mulheres em período reprodutivo, apontada como a principal causa de infertilidade feminina (1). Além dos sintomas como anovulação crônica, distúrbio menstrual e manifestações de altos níveis de androgênios circulantes e/ou sinais clínicos de excesso deste hormônio, esta síndrome tem associação com obesidade, diabetes mellitus tipo II (DM2), dislipidemia,

resistência à insulina e doenças cardiovasculares (2).

Algumas características como a ultrassonografia indicativa de policistos nos ovários, juntamente com os excessos de androgênios evidenciados, mostram que a SOP é resultado de uma desordem crônica, na qual os sinais começam a aparecer antes da puberdade e em alguns casos, como uma adrenarca precoce. Os sinais e sintomas da síndrome podem se manifestar em qualquer faixa etária da vida reprodutiva, e as manifestações clínicas variam de mulher para mulher (3).

¹ Biomedica da Faculdade Ingá

² Docente Doutora do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade Ingá

³ Docente Mestre do Curso de Graduação em Biomedicina e Medicina da Faculdade Ingá

Existem hipóteses de que a SOP seja uma doença ovariana de caráter genético que se caracteriza pela produção excessiva de andrógeno e a sua grande variabilidade é explicada com base na interação da síndrome com outros genes e com o ambiente. Mas devido à grande quantidade de mulheres afetadas e a variação dos sintomas, a interação de genes com os fatores ambientais são o que melhor explicam a SOP (4).

Hoje em dia, estudos de associação estão sendo realizados para averiguar a influência genética na SOP. Como o hiperandrogenismo é característica constante entre os fenótipos de SOP, investigações estão sendo realizadas em genes que participam da biossíntese de androgênios em busca de uma possível associação com essa síndrome (2).

Os Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs – polimorfismos de troca de um único nucleotídeo)- contribuem nas avaliações gênicas individuais, nas doenças que apresentam uma base multigênica complexa como a SOP (5). Como exemplo, o SNP T45G em mulheres com SOP encontra-se associado com maior índice nos níveis de insulina de jejum e glicose (6).

A etiopatologia da SOP ainda não foi claramente estabelecida, mas os aspectos fisiopatológicos incluem os defeitos primários na função do eixo hipotálamo-hipófise, a atividade ovariana e a ação da insulina. No entanto, nenhum deles explica globalmente as múltiplas anormalidades associadas à SOP.

Tendo em vista que a SOP é multifatorial e fatores genéticos e bioquímicos podem estar envolvidos, o objetivo desse trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico dos principais marcadores moleculares e bioquímicos e os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da SOP.

Marcadores Moleculares e Bioquímicos Envolvidos na SOP

Os marcadores moleculares são sequências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos. Por serem características herdáveis e estáveis, são utilizados para obter maior quantidade de informações de uma espécie (8).

Variantes genéticas comuns têm contribuído de maneira significativa para a susceptibilidade genética às doenças. A utilidade desses marcadores é determinada pela heterozigosidade na população e qualquer abordagem de descoberta de SNPs envolve tanto a sequência de DNA quanto a determinação de sua frequência alélica. Os estudos de associação genética diretos testam a hipótese de que determinado SNP é o fator causal na predisposição à susceptibilidade à doença quando a sua frequência é significativamente maior quando nos indivíduos afetados versus não afetados (5).

Devido às limitações dos estudos genéticos da SOP, alguns loci vem sendo estudados e apresentando tendência de associação com a síndrome. Entre esses loci estão inclusos CAPN10, LHB, 17 β HSDs.

Diversas vias bioquímicas têm sido implicadas na patogênese da SOP. Muitos genes destas vias têm sido testados, incluindo-se genes envolvidos na biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides, gonadotrofina e hormônios de ação gonadal, obesidade e regulação de energia, genes relacionados à secreção e ação da insulina entre outros.

Calpaína 10 (CAPN-10)

A calpaína-10 é um membro da família das calpaínas (calcium activated neutral proteases) de proteases de cisteína não lisossomal que catalisam a clivagem endoproteolítica do substrato específico envolvido com diversas funções celulares, incluindo a sinalização intracelular. A proteína possui 74,9 kDa, e se expressa em muitos tecidos incluindo aqueles envolvidos com a patogênese do diabetes mellitus (DM) nas ilhotas pancreáticas, músculo esquelético e fígado (5).

Essas são proteinases que modulam a atividade celular e que possui em sua estrutura um domínio cisteína-proteinase combinado com uma calmodulina ligada ao $i[Ca^{2+}]$. Estruturalmente são heterodímeros consistindo de uma pequena subunidade invariável e uma grande subunidade catalítica variável. Esta grande subunidade catalítica tem quatro domínios: domínio I- regulador amino terminal; domínio II-proteolítico, homólogo à papaína; domínio III-com função desconhecida; e o

domínio IV- que se caracteriza pela presença do domínio de ligação semelhante à calmodulina dependente de $[Ca^{2+}]$ (5).

A CAPN-10 é uma calpaína diferente, atípica (9), pois o domínio IV não se constitui no clássico domínio calmodulina-símile, mas contém uma região carboxiterminal divergente (5). Acredita-se que a CAPN10 está relacionada à diferenciação dos adipócitos, à produção de glicose hepática, ao metabolismo dos ácidos graxos livres e à ação e secreção da insulina (9). O seu gene codifica um membro da família de cisteína proteases, posicionalmente clonado dentro da região NIDDM1 (5), localiza-se no braço longo do cromossomo 2. É composto por 15 éxons que produzem proteínas que variam de 138 a 672 aminoácidos (9).

Os estudos de associação usando marcadores intragênicos do gene da calpaína-10 (CAPN-10) revelam que diferentes alelos podem contribuir para a predisposição ao DM2 (diabetes mellitus tipo II) em diversas populações, bem como modificar o processamento da pró-insulina e da secreção de insulina em indivíduos não diabéticos (5).

A determinação do background genético da SOP tem sido um desafio para os pesquisadores com interesse na fisiopatogenia desta doença. Pelas semelhanças metabólicas encontradas entre SOP e DM2, o gene CAPN10 torna-se um forte candidato para explicar características fenotípicas que são mais prevalentes nas mulheres com SOP em comparação com a população geral com a presença de resistência insulínica independente da obesidade (9).

O primeiro estudo do gene CAPN-10 em mulheres com SOP, realizado no Reino Unido, forneceu a primeira evidência de seu envolvimento na susceptibilidade à síndrome. Esse estudo apresentou uma associação estatisticamente significativa entre o SNP-44 e a SOP. Contudo, os mesmos pesquisadores posteriormente estudaram o mesmo grupo de SNPs e não confirmou seus achados preliminares na análise mais extensa e recentemente publicada (10).

Na última década, alguns estudos examinaram a contribuição do gene CAPN10 na etiologia da SOP (9,11-15). Em um estudo com a população espanhola foi verificada a frequência alélica e genotípica das variantes polimórficas UCSNP-44, UCSNP-43, UCSNP-

19 e UCSNP-63 da CAPN-10 em 55 mulheres com SOP e 93 controles. Os resultados indicaram uma associação entre UCSNP-44 (CAPN10-g4841T/C, intron3) e o diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos ($p=0.01$), tornando-se ainda mais evidente a associação com as manifestações clínicas de hiperandrogenismo (12).

Outros pesquisadores, avaliaram 212 mulheres com SOP, sendo 124 de origem europeia, 57 afro-americanas, 13 hispânicas, 13 asiáticas e 5 do oriente médio. Foram genotipados 3 polimorfismos da CAPN10 (UCSNP-43, UCSNP-19 E UCSNP-63) e foram analisadas as pacientes caucasianas e afro-americanas para presença de associação com SOP e características relacionadas com DM2. Não houve diferença significativa na frequência alélica ou haplótipica quando comparadas as duas populações (13).

Em outro estudo foram genotipados os polimorfismos UCSNP-44, UCSNP-43 e UCSNP-45 do gene da CAPN-10 em 97 mulheres hiperandrogênicas, comparadas com 37 controles normais. Foi encontrada uma relação da presença do alelo polimórfico em homozigose no locus UCSNP-43 com maior grau do hirsutismo, independente do diagnóstico etiológico. Também demonstraram uma maior frequência do alelo polimórfico no UCSNP-45 nas pacientes hirsutas, porém o pequeno número de pacientes analisadas não permite conclusões definitivas sobre este achado (14).

Em contrapartida, outros pesquisadores não encontraram associação entre os polimorfismos UCSNP-44, UCSNP-43, UCSNP-19, e UCSNP-63 da CAPN10, isolados ou formando haplótipos, com susceptibilidade para PCOS em uma amostra de pacientes caucasianas de origem europeia (15).

Um estudo detalhado da região NIDDM1 conduziu à descoberta do gene da calpaína-10 que codifica uma cisteína-protease. A genotipagem desta região realizada através dos diversos SNPs e o mapeamento do intervalo candidato à DM2 revelou um polimorfismo – UCSNP-43 associado ao DM2. Como isoladamente o UCSNP-43 não explicava a ligação relatada anteriormente pelos pares de irmãos afetados, os autores buscaram diferentes combinações de haplótipos com três SNPs marcadores da

região. Estes marcadores polimórficos descritos foram: UCSNP-43 (G/A no intron3), UCSNP-19 (2R/3R repetições de 32 pb no intron 6) e UCSNP-63 (C/T no intron 13). Uma combinação de dois haplótipos geralmente pela variação de SNPs, designado por UCSN-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 conferem risco aumentado ao DM2. Todos os SNPs estão localizados na região intrônica da calpaína (16).

Ainda permanece incerto se a variante intrônica influencia a função do gene diretamente, ou se é um desequilíbrio de ligação com a função da variante. Evidências sugerem que a variação do UCSNP-43 da CAPN-10 afeta a transcrição do gene e, esta evidência é suportada pela observação da diminuição dos níveis de RNAm nos músculos esqueléticos de indivíduos resistentes à insulina homocigotos para o alelo G no UCSNP-43. A homocigosidade para o alelo G do UCSNP-43 é parte do alto risco da combinação haplótica, a qual é bastante raro em populações do norte da Europa. Além de que, o polimorfismo UCSNP-43 estava associado a uma diminuição do RNAm no músculo esquelético e nos estados de resistência insulínica. Trata-se de uma proteína que ainda não tem seu efeito definido, mas parece estar implicada na predisposição ao DM2 em certas populações. Também está envolvida na proliferação, diferenciação e

secreção de insulina (5) confirmando assim a evidência que o gene da CAPN-10 pode estar envolvido com a resistência insulina influenciando diretamente na SOP.

Vollmert et al. (2007), selecionaram uma amostra com oito variantes (UCSNP44, 43, 56, ins/Del 19, 110, 58, 63 e 22) do gene CAPN10. Genotiparam 606 mulheres normais e 146 pacientes com SOP para determinar quais variações no gene CAPN10 predispunham a SOP. Foram encontradas associações significativas entre SOP e UCSNP-56 e alta correlação entre SOP a ins/del-19 (11).

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais pesquisas envolvendo o polimorfismo do gene CAPN-10.

Estudos envolvendo esse marcador podem servir como diagnóstico de exclusão para doenças que apresentam não só fenótipos semelhantes ao da SOP e, como também nos permite observar que diferentes alelos podem contribuir para a predisposição ao DM2, bem como modificar o processamento e secreção de insulina em portadoras não diabéticas.

Tabela 1. Listagem dos estudos sobre análise de polimorfismo do gene CAPN-10 e seus resultados quanto a associação com a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).

| Polimorfismo CAPN-10 | Associação | Referências |
|----------------------|---|-------------|
| <i>UCSNP-44</i> | Associado com SOP | 10 |
| <i>UCSNP-43</i> | Associado com SOP e susceptibilidade DM2* | 16 |
| <i>UCSNP-43</i> | Associado com SOP e susceptibilidade hirsutismo | 14 |
| <i>UCSNP-44</i> | Associado com SOP | 12 |
| <i>UCSNP-56</i> | Associada com SOP | 11 |
| <i>Ins/del-19</i> | Associada com SOP | 11 |



Subunidade beta do Hormônio Luteinizante (LHB)

O gene que codifica a subunidade beta específica do LH pode ser considerado um candidato potencialmente relevante na patogênese da SOP. Contudo, apesar das alterações funcionais evidenciadas na pulsatilidade do LH, estudos recentes de associação ampla do genoma não confirmam a hipótese de um papel causal de alterações genéticas no LH na etiologia da SOP (17).

Um número significativo de mulheres com SOP apresentam anormalidades na secreção de gonadotrofinas. As características dessa anormalidade são representadas por uma elevação nas concentrações e pela resposta exagerada do LH ao hormônio liberador de gonadotrofina GnRH exógeno, isto pode estar relacionada com o aumento de andrógenos característicos da síndrome (17).

A resistência insulínica (RI) é uma anormalidade metabólica comum nas pacientes com SOP, independente do seu peso corporal, sugerindo assim, que a obesidade e a SOP exerçam efeitos independentes sobre a resistência à insulina. Em 2005, Deugarte e colaboradores demonstraram uma prevalência de resistência à insulina de 64% em mulheres com SOP, usando HOMA-IR (homeostasis model assessment) ajustado para variáveis de raça, idade e índice de massa corporal. Além disso, essas pacientes eram mais afetadas clinicamente quando comparadas ao grupo com SOP sem resistência à insulina (18). Essa hiperinsulinemia derivada da RI favorece a hiperandrogenemia por diversos mecanismos. Na hipófise favorece o aumento da amplitude dos pulsos de LH e paralelamente, tem ação sinérgica ao LH na esteroidogênese ovariana, por meio da fosforilação em serina do citocromo P450c17, levando ao estímulo da produção ovariana de andrógenos e inibindo a produção hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e da proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-1), resultando no aumento das concentrações de testosterona biodisponível (18).

As gonadotrofinas LH e Hormônio Foliculo Estimulante (FSH) pertencem a família de hormônios glicoprotéicos, com estrutura heterodimérica, composta por uma subunidade alfa comum e uma subunidade beta específica, associadas por meio de ligações não-covalentes. As subunidades beta

do LH são compostas por 121 aminoácidos, seus genes codificadores estão localizados no braço longo do cromossomo 19 (19q13.3), são ricas em cisteínas e formam seis ligações dissulfídicas entre esses resíduos, que conferem a estabilização da estrutura tridimensional dessas proteínas, essencial para garantir a atividade biológica do dímero alfa-beta. Contêm ainda moléculas de carboidratos, cadeias de oligossacarídeos ligadas a resíduos de asparagina que tem papel importante na ação biológica e metabolismo desses hormônios (17).

Em 1992 Pettersson (19) descreveu, pela primeira vez, uma forma variante comum do LH em uma população de mulheres finlandesas. A partir daí, variantes do LH têm sido vistas em diversas populações, saudáveis ou não, com sua frequência variando de 0 % a 54%. Algumas alterações clínicas têm sido relacionadas a essas formas variantes do LH como um aumento na frequência de distúrbios reprodutivos em mulheres, incluindo infertilidade inexplicada, e falência ovariana prematura (19).

As pacientes LH variantes tiveram uma redução significativa da concentração sérica do LH após quinze minutos da injeção do GnRH em relação às pacientes não variantes. Essa redução da meia vida sérica poderia ser explicada por uma sulfatação extra de um carboidrato da molécula do LH variante, pois os carboidratos sulfatados tem a propriedade de serem eliminados mais rapidamente da circulação por apresentarem maior especificidade de ligação a receptores hepáticos (20).

Outros pesquisadores descrevem que mutação em posição Ile15Thr está associada a uma glicosilação extra na posição Asn13, negativamente o LHB e tornando-se assim, hidrofílica. Como cerca de 30% da excreção do LH é renal, a modificação da carga protéica do LH variante influencia a sua excreção e consequentemente, sua meia vida plasmática (21).

A frequência do polimorfismo rs1800447/rs34349826 no gene LHB diverge entre os diferentes grupos étnicos. Essa mutação vem sendo identificada mundialmente em indivíduos inférteis, férteis e saudáveis, com frequências elevadas como 41,9% na população finlandesa e 53,5% em aborígenes australianos. Na população de negros sul-africanos a incidência é de 17,9%; em tchecos 17,5% e em japoneses e chineses, 12% e 14%

respectivamente. Sobre a frequência da variante do LH em mulheres com SOP, foi descrito na Inglaterra, uma frequência de 15% do genótipo heterozigoto (TC/TC) em mulheres saudáveis e de 21% em obesas com SOP. Posteriormente, foram descritas nas populações americanas, finlandesas e americanas, presença de 22% a 72% do genótipo heterozigoto (TC/TC) em mulheres com SOP (22).

Em um estudo na Turquia, a variante LH foi analisada por comparação em um grupo de mulheres com SOP e outro grupo sem a síndrome, e foi observada uma frequência de 3% em mulheres com SOP e de 17% em mulheres do grupo controle (22).

No estudo realizado por Borba (22), 50 pacientes com diagnóstico de SOP foram analisados quanto à existência dos polimorfismos rs1800447/rs34349826 do gene LHB e a frequência encontrada foi de 8,7% para o genótipo heterozigoto TC. A frequência alélica (alelo: T=95,4% e C=4,5%), foi semelhante aos valores descritos, conforme as populações estudadas: para os europeus, a frequência do alelo T é de 88,3%, e do C é de 11,7%, para os africanos, o alelo T tem 93,5% de presença e o alelo C tem 6,5%, já nos asiáticos, o T está presente em 96% e o C em 4% dos casos (22).

Em outro estudo foram avaliadas as concentrações séricas do LH por ensaio convencional de quimioluminescência em mulheres com SOP, e encontrou-se valores inferiores para mulheres rs1800447/rs34349826 com genótipo heterozigoto (TC/TC) em relação ao grupo de mulheres saudáveis, com $p=0,03$ (23).

No Brasil não existe estudo semelhante de análise de frequência do LH variante rs1800447/rs34349826 em mulheres com SOP, mas foi avaliado a presença do polimorfismo do gene LHB rs1800447/rs34349826 em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico. A concentração sérica do LH foi medida por método imunofluorimétrico e não houve relação entre a presença da variante alélica C com os valores de LH para grupo genótipo heterozigoto (TC/TC) em relação ao grupo saudável (22).

Borba (22) observou diferentes valores para o índice de hirsutismo semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey na presença do alelo variante C para o

rs1800447/rs34349826, com $p=0,04$. Para esse polimorfismo, no grupo de mulheres com SOP estudado, entre os pacientes com genótipo homozigoto (TT/TT), 69% apresentavam-se hirsutas. Entre as pacientes heterozigotas (TC/TC), todas hirsutas, 25% apresentou hirsutismo leve e 75% hirsutismo grave. Estudos anteriores mostraram associação da SOP com hirsutismo em 86% e 56,7% dos casos (22).

Considerando o envolvimento do LH na SOP e a possível repercussão funcional de variantes do LH na fisiopatogenia de disfunções reprodutivas, fica evidente que estudos ampliados da frequência dos diversos polimorfismos do gene LHB por sequenciamento genético podem complementar informações a respeito da associação dessas variantes, isoladas ou combinadas com a fisiopatogenia da síndrome ou com a heterogeneidade de suas manifestações clínicas (17).

17 β -hidroxiesteróide-desidrogenases (17 β HSDs)

As 17 β -hidroxiesteróide-desidrogenases (17 β HSDs) são enzimas oxidoreduzases (2) que estão envolvidas na formação de esteróides sexuais ativos e, promovem a catálise na formação de todos os estrogênios e androgênios que requerem a presença de um grupamento hidroxila na posição 17 β do núcleo esteróide (24).

Na década de 60 começaram os estudos que comprovam que a atividade dessa enzima está presente não só nos tecidos esteroidogênicos clássicos, mas também é visto em tecidos periféricos como o tecido adiposo, endométrio, pele, mucosa vaginal, hemácias, células cancerígenas mamárias e prostáticas (24), fígado, pulmão e células cancerígenas (2).

A biossíntese da testosterona requer a atividade androgênica da 17 β HSD, em especial das isoformas tipo 3 (17 β HSD3) e tipo 5 (17 β HSD5), que catalisam a reação de redução da androstenediona em testosterona. A 17 β HSD3 encontra-se nos testículos e é necessária para a diferenciação e desenvolvimento sexual. A 17 β HSD5 é encontrada nos ovários, glândulas adrenais, testículos, fígado, rins, pulmões, placenta, cérebro e próstata, desempenhando papel importante na síntese de androgênios femininos (24).



A 17 β HSD5 é uma proteína que pertence a família aldo-cetoreduases (ARK), sendo a única entre as 17 β HSDs a pertencer a essa família (2). Conhecida como AKR1C3, é a principal responsável pela reação de redução da androstenediona em testosterona nas células tecais ovarianas e nas glândulas adrenais (24). O gene que codifica a 17 β HSD5 (HSD17B5) (ID: 8644) é composto por nove éxons, abrangendo 16Kb e está localizado no cromossomo 10p14, 15 (25). Tem sido alvo de estudos que avaliam associações dos níveis de expressão e de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com características clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo, SOP e pubarca precoce (PP) (24).

Em estudo de imunohistoquímica com tecido ovariano humano, foi verificada a presença da 17 β HSD5 nas células da teca ovariana, responsáveis pela produção de androgênios nas mulheres, enquanto que as células da granulosa ovariana, que produzem estrogênios e progesterona não foram marcadas pelo anticorpo para 17 β HSD5. Com isso, se enfatiza o papel dessa enzima na produção de androgênios pelo sexo feminino (24).

Quin et al. (2006), quando analisaram a sequência promotora do gene AKR1C3 de uma paciente com hipertricose, verificaram a existência da substituição de uma adenina por uma guanina a 71 pares de bases do sítio de início da transcrição do gene (-71A>G). Comparando as frequências genotípicas da variante em mulheres com e sem SOP, o mesmo estudo mostrou que o alelo G é mais frequente nas pacientes com SOP, e que a variante se trata de um SNP (26).

Outros pesquisadores testaram a relevância clínica previamente descrita do polimorfismo-71AG do gene AKR1C3 em meninas com PP. Porém, não encontraram associações deste polimorfismo com PP, com sinais clínicos de hiperandrogenismo como acne e hirsutismo, ou com concentrações séricas de testosterona (27). A associação do SNP -71AG com SOP e níveis de testosterona não foi confirmado quando genotiparam uma amostra maior de mulheres caucasianas. Também não encontraram diferenças na frequência genotípica do SNP-71AG entre mulheres com PCOS, mas Marioli et al. (2008) (28) expuseram que a presença da variante genética está relacionada com aumento nos níveis de testosterona.

Em outro estudo avaliaram os 330 polimorfismos presentes no gene AKR1C3, estudos identificaram um polimorfismo funcional na região promotora (posição - 71, troca de A por G), registrado pelo rs3763676, o que pode ser o possível fator para as alterações de expressão gênica e ter relação com os fenótipos de hiperandrogenismo, PCOS e PP (26).

Um grupo de pesquisadores buscou reproduzir os dados já existentes na literatura sobre o SNP-AG da região promotora do gene 17 β HSD com risco para PCOS e não obtiveram confirmação dos dados. Avaliaram além do SNP rs3763676 (SNP - 71AG), rs12529, rs17396032, rs2518049 e rs1937841 em 287 mulheres com PCOS e 187 mulheres controle. Não encontraram associação entre os polimorfismos isolados, bem como haplótipos, e o diagnóstico de PCOS ou níveis de testosterona (24).

Por fim, uma pesquisa populacional, realizada em 2010, com 24.341 mulheres americanas, inscritas do Nurses' Health Study e Wome's Genome Health teve como objetivo avaliar a associação de 278 genes (incluindo o gene 17 β HSDs), compreendendo 336.108 SNP, com a idade da menarca e da menopausa natural, não encontrando associação significativa entre SNPs do gene que codifica a 17 β HSD5 e as características de interesse do estudo (24).

Em conclusão, o polimorfismo no 17 β HSDs, manifesta-se pela presença de resistência à insulina, que desempenha um papel significativo na patogênese da SOP, e estudos acreditam que este seja o primeiro candidato a polimorfismo genético que pode contribuir diretamente para um aspecto fenotípico da SOP (26).

17hidroxi-progesterona (17OHP)

Mulheres com hiperplasia congênita adrenal (HCSR) de forma não clássica também apresentam como manifestações hirsutismo, acne, irregularidade menstrual, tornando-se indistinguível da SOP. A forma mais comum desse distúrbio ocorre por deficiência da enzima 21-hidroxilase e se caracteriza por alteração da esteroidogênese adrenal, aumentando os níveis da 17OHP que se comporta como marcador desta patologia. O aumento da 17OHP ocorre por um bloqueio na transformação deste hormônio em 11-desoxicortisol, mediada pela 21-hidroxilase

(29). O diagnóstico diferencial entre essas duas patologias pode ser feito tanto com a concentração basal de 17OHP quanto após estímulo com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintético (250 mg por via endovenosa, em bolus, com coleta de sangue 60 minutos após) (30).

É recomendado que mulheres com quadro clínico de SOP realizem screening para HCSR através da dosagem da 17OHP. Essas mulheres podem apresentar níveis basais de 17OHP acima dos valores de referência e mostrar resposta aumentada da 17OHP, androstenediona e testosterona ao teste de estímulo com análogo do GnRH quando comparadas a mulheres normais na fase folicular (29).

O aumento da secreção de andrógenos adrenais e ovarianos é comum em mulheres com SOP. A 17OHP faz parte tanto da esteroidogênese adrenal quanto ovariana. No estudo realizado por Pinheiro & Clapauch (29), observou-se que a dosagem na fase folicular foi mais frequentemente acima do valor normal, superando também o percentual de aumento de volume ovariano. O aumento médio foi de 30% acima do normal, com mediana de 18%. A literatura mostra que a 17OHP nas pacientes com SOP está em média 20% acima do normal (29).

Proteína C Reativa Ultra Sensível (PCR-US)

A resistência à insulina está diretamente relacionada à formação da placa aterosclerótica. Ela desempenha papel central no desenvolvimento da disfunção endotelial (evento precoce no processo de aterosclerose), através da indução de distúrbios nas vias de sinalização comuns tanto à ação da insulina quanto à produção do óxido nítrico, além de aumentar o estresse oxidativo, os níveis de endotelina-1 (ET-1), a atividade do sistema renina-angiotensina e a secreção de hormônios e citocinas pelo tecido adiposo. A disfunção endotelial se caracteriza pela menor produção de óxido nítrico, que em concentrações normais inibe vários processos aterogênicos, tais como a adesão de plaquetas e monócitos, a oxidação do LDL e, a síntese de citocinas inflamatórias. A diminuição da dilatação mediada por fluxo da artéria braquial, que resulta na hiperemia da mão, tem sido observada em mulheres jovens com SOP (31).

Foi constatado que mulheres com SOP representam um importante grupo populacional de risco para doença

cardiovascular (DCV) e, portanto, muitos pesquisadores estão realizando pesquisas voltadas para a detecção precoce desses fatores (32).

Talbot et al. (2004), fizeram uma avaliação da espessurada camada íntima-média da carótida (IMT) pelo Doppler nas mulheres acometidas por SOP de meia idade, constatando espessuras maiores das camadas íntima/média e incremento nas concentrações séricas de proteína C reativa ultra-sensível, quando comparadas ao grupo controle (33).

Quando compararam mulheres jovens com SOP sem sobrepeso ou sem qualquer outro fator de risco cardiovascular com controles pareados por idade, observaram nítido comprometimento da reatividade e do espessamento das camadas íntima-média da artéria braquial naquelas com a síndrome, comprovando o acometimento endotelial precoce na população com SOP (34).

Devido a esses achados referirem-se a placas já estabelecidas, pesquisadores se questionaram sobre o que está ocorrendo nos estágios mais iniciais do processo aterosclerótico, como uma possível disfunção endotelial, que se caracteriza inicialmente pela presença de um processo inflamatório simples. Por isso, a avaliação dos marcadores inflamatórios vem adquirindo especial significado para caracterizar precocemente o processo de aterogênese nas portadoras de SOP e, dentre esses, o mais consagrado é a proteína C reativa ultra sensível (PCR-US) (32).

A PCR-US além de marcador de inflamação, pode ter papel direto na aterogênese através de expressão da molécula de adesão, ativação do complemento e mediação de captação de LDL por macrófagos. A homocisteína é outro marcador bioquímico, sendo que seus níveis elevados são fator de risco para doenças cardiovasculares devido ao aumento do estresse oxidativo no endotélio vascular e ativação da agregação plaquetária (1).

As concentrações de proteína C reativa (PCR) estão aumentadas tanto nas pacientes com SOP obesas como nas não-obesas, quando comparadas às controles pareadas para o peso. Níveis de PCR acima de 5 mg/L (indicativos de alto risco cardiovascular) são observados em 37% das pacientes com SOP e em só 10% das controles. A PCR também pode estar diretamente envolvida no processo aterogênico



(promoção da disfunção endotelial, aumento da síntese de moléculas de adesão solúveis e da secreção de proteínas quimiotáticas dos monócitos). Quarenta e cinco por cento das pacientes com SOP clássica (anovulatória) e 38% daquelas com SOP ovulatória apresentam dislipidemia ou aumento de PCR ou ainda aumento de homocisteína, diferentemente das mulheres com hirsutismo idiopático e das controles, nas quais a prevalência é de 10% (31).

Outros indicadores de aterosclerose subclínica têm sido estudados nas pacientes com SOP. Trinta e nove por cento das obesas com SOP apresentam calcificação da artéria coronária na tomografia computadorizada, comparados a 21% das pacientes controle obesas. A espessura da íntima-média da artéria carótida, marcador estrutural de doença arterial que se altera mais tarde na progressão da aterosclerose que os marcadores funcionais (dilatação da artéria braquial mediada por fluxo e velocidade da onda de pulso na artéria braquial), também está aumentada nas pacientes com PCOS, principalmente após a menopausa, e se correlaciona inversamente com os níveis de SDHEA (31).

Recentemente, um estudo mostrou que mesmo jovens não-obesas, não-hipertensas e não-dislipidêmicas com SOP apresentam maiores níveis de insulina e de ET-1 e maior espessura da íntima-média da artéria carótida quando comparadas a mulheres controle, pareadas para idade e IMC, sugerindo que o aumento da espessura da íntima-média não está associado somente à exposição prolongada a perfil cardiovascular adverso (31).

Alterações assintomáticas da função cardíaca (hipertrofia do ventrículo esquerdo e disfunção diastólica) também têm sido visualizada em jovens com SOP, muito antes do aparecimento da hipertensão ou do aumento da espessura íntima-média da carótida, em decorrência dos efeitos mitogênicos da insulina (31).

Foi constatado maiores valores de proteína C reativa e de homocisteína nas portadoras de SOP do que em mulheres saudáveis. Constatou-se que o aumento dessas substâncias atua como preditor independente de uma pior recuperação na frequência cardíaca (35).

Nacul et. al (36) relataram que as concentrações de fibrinogênio e dos metabólitos de óxido nítrico não se alteraram na SOP, apesar de terem visualizado nítida correlação entre esses marcadores e a presença de resistência insulínica (36).

Atualmente, novos marcadores de aterogênese estão sendo estudados, como as interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10), a homocisteína, os óxidos de colesterol, os metabólitos do óxido nítrico (NO), e as mieloperoxidases (32), mas ainda não mostraram resultados significativos que comprovam a associação com a SOP.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A SOP é uma síndrome que depende de uma combinação dos seus elementos fundamentais, e seu diagnóstico baseia-se na exclusão de outras doenças que apresentem fenótipo semelhante ao seu. Apresenta distúrbios reprodutivos e até estéticos, com risco de desenvolver carcinoma no endométrio, diabetes mellitus tipo II, dislipidemias, hipertensão arterial e, doenças cardiovasculares, causadas possivelmente pela presença da resistência à insulina que a síndrome apresenta.

As variantes genéticas comuns existentes da SOP têm contribuído de maneira significativa para a susceptibilidade genética à doença. Diversas vias bioquímicas têm sido envolvidas na patogênese da SOP e estudos como os revisados nesse trabalho verificaram a existência de alguns loci, existindo uma evidência considerável de acordo com o papel na SOP. Entre estes loci incluem-se a CAPN-10, LHB, HSD17B5 e os marcadores bioquímicos como a 17OHP e a PCR-US.

A calpaína-10 ajuda no diagnóstico da SOP por ser um marcador para distúrbios metabólicos, como a obesidade e resistência insulínica. Estudos envolvendo esse marcador podem servir como diagnóstico de exclusão para doenças que apresentam não só fenótipos semelhantes ao da SOP, como também as características clínicas, sendo o hirsutismo um exemplo. Estudos realizados com marcadores intragênicos da calpaína-10 também nos permitem observar que diferentes alelos podem contribuir para a predisposição ao DM2, bem como modificar o processamento e secreção de insulina em portadoras não diabéticas.

Outros marcadores relevantes são os polimorfismos do gene LHB, que nos permitem identificar parâmetros da SOP como o hiperandrogenismo, hirsutismo, resistência insulínica e até infertilidade, relacionados com a alteração dos hormônios sexuais. O estudo da frequência de polimorfismos do gene LHB também pode acrescentar dados a respeito da fisiopatogenia da doença.

Já o polimorfismo do gene HSD17B5 manifesta-se pela presença de resistência à insulina, que desempenha um papel significativo na patogênese da SOP. É considerado o primeiro candidato a polimorfismo gênico que pode contribuir diretamente para um aspecto fenotípico da SOP.

A 17OHP é usada como marcador da SOP para diferenciá-la da hiperplasia congênita adrenal, a qual apresenta as mesmas manifestações clínicas da SOP. Essas manifestações, como hirsutismo, acne e irregularidade menstrual são causadas comumente pela deficiência da enzima 21-

hidroxilase, e aumentam os níveis da 17OHP, que se comporta como marcador para a SOP.

Mulheres com SOP têm risco de desenvolver doenças cardíacas devido à resistência insulínica, que está diretamente relacionada à formação da placa aterosclerótica. Por isso, a utilização da PCR-US como marcador inflamatório vem sendo utilizada para caracterizar precocemente o processo de aterogênese nessas portadoras da patologia.

Devido a sua grande heterogeneidade genética e fenotípica, a maioria desses estudos ainda não foi conclusiva para determinar um papel causal na SOP.

O estudo de possíveis fatores genéticos e bioquímicos associados ao desenvolvimento da SOP deve ser analisado, de modo a ajudar na identificação de fatores de risco hereditário ou não, e possibilitar o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e alvos terapêuticos voltados para identificação e caracterização dos diversos fatores envolvidos na SOP.

**Michelle Daiane Antunes, Gléia Cristina Laverde Ricci,
Luciana Conci Macedo**

*Endereço para correspondência: Rua Campos Sales, 631
Maringá - PR*

E-mail: luconci@gmail.com

Recebido em 17/02/2014

Revisado em 19/05/2014

Aceito em 19/07/2014

REFERÊNCIAS

- (1) ARAUJO, D. R. **Inflamação, síndrome metabólica e marcadores de risco cardiovascular em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos.** 2012. 86f. Dissertação (Mestrado em Saúde Materno-Infantil) - Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2012.
- (2) MAIER, P. S. **Frequência de polimorfismos nos genes codificadores das enzimas 17 β HSD5 e aromatase em mulheres com diferentes fenótipos da Síndrome dos Ovários Policísticos e resposta ao tratamento com anticoncepcional oral.** 2012. 79f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- (3) URBANETZ, A. A; OLIVEIRA M. T. C. R de. **Síndrome dos ovários policísticos: aspectos atuais das abordagens terapêuticas, Parte 1. Revista Femina, Rio de Janeiro, v. 37, n.5, p. 255-260, maio, 2009.**
- (4) HAUER, I. R. **Análise genética de região candidata à susceptibilidade para a Síndrome do Ovário Policístico (SOP).** 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2008.
- (5) FURTADO, L. B. F. S. **Variantes genéticas da calpaína-10 (CAPN-10) numa amostra de pacientes hiperandrogênicas.** 2005. 99f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- (6) BAGATINI, S. R. **Polimorfismos do gene da adiponectina e variáveis clínicas, metabólicas e hormonais em mulheres com ou sem a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) e investigação de um modelo animal para o estudo da PCOS.** 2010. 100f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- (7) THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP (2004) Revised 2003 Consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **European Society of Human Reproduction and Embryology, v. 19, n.1, p.41-47, 2004.**
- (8) COUTINHO, H. D. M; NETO V. M; VERDE, L. C. L. **Técnicas com marcadores moleculares usadas nas Ciências da Saúde. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v.10, n.2, p.177-188, 2006.**
- (9) WILTGEN, D. **Polimorfismos do gene da calpaína 10 (CAPN10) e associação com Síndrome Metabólica em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS).** 2005. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- (10) HADDAD, L.; et al. **Linkage and association of variants of the diabetes susceptibility-gene NIDDM1 CAO10 with polycystic ovary syndrome in European parent-offspring trios. In: Program oh the 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, Ontario, Canada, (abstract 273), 2000,p.75.**
- (11) VOLLMERT, C.; et al. **Calpain-10 variants and haplotypes are associated whit polycystic ovary syndrome in caucasians. American Journal of Physiology – Endocrinology and**

- Metabolism**, v.292, n.1, p. 836-844, march. 2007.
- (12) GONZALEZ, A. et. al Specific CAPN10 haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.88, n.11, p.5529-553, november. 2003.
- (13) EHRMANN, D. A.; et. al. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. **Diabetes Care**, v. 22, n.1, p.141-146, January. 1999.
- (14) ESCOBAR, H. F. M.; et. al. Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. **FertilitySterility**, v. 77, n.3, p. 581-587, march. 2002.
- (15) HADDAD, L.; et. al. Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v.87, n.6, p.2606-2610, june. 2002.
- (16) HORIKAWA, Y.; et. al. Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in japaneses. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v.88, p.244-247, 2003.
- (17) BATISTA, M. C. P. **Estudo dos polimorfismos no gene da subunidade beta do LH em mulheres brasileiras com e sem a síndrome dos ovários policísticos**. 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- (18) DEUGARTE, C. M.; BARTOLUCCI, A. A.; AZZIZ, R. Prevalence of insulinin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. **FertilitySterility**, v.83, n.5, p.1454-1460, may. 2005.
- (19) PETERSSON, K.; DING, Y. Q.; HUHTANIEMI, I. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v.74. n.1, p.164-171, january.1992.
- (20) TAKAHASHI, K.; et al. Pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in women with variant luteinizing hormone. **Society of the European Journal of Endocrinology**, v.143, n. 3, p. 375-381, 2000.
- (21) SUGANUMA, N.; et. al. Effect of the mutations (Trp8aArg and Ile15aThr) in human luteinizing hormone (LH) b-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. **Society of the European Journal of Endocrinology**, v. 137, p.831-838, 1996.
- (22) BORBA, M. D. R. **Análise da frequência de polimorfismos no gene LHB e parâmetros clínicos em portadoras de síndrome de ovários policísticos**. 2009. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- (23) KORAY, E.; et. al. Role of the mutations Trp8 =>Agr and Ile15 =>Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility Sterility**,v.71, n.3, p.425-430, march. 1999.
- (24) SANTOS, B. R.**Estudo da associação entre polimorfismos do gene do receptor de Vitamina D (VDR) e do SNP-71A/G do gene 17β-hidroxiesteróidesdesidrogenase tipo 5 (HSD17B5) e variáveis clínicas, hormonais e metabólicas em pacientes com pubarca precoce e controles**. 2011. 91f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- (25) AKR1C3 aldo-ketoreductase family 1, member C3 [*Homo sapiens* (human)]. Disponível em<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8644>>. Acesso em 22 de julho de 2013.
- (26) QUIN, K.; et. al. Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 1, p. 270-276, January. 2006.
- (27) PETRY, C. J.; et. al. Lack of association between common polymorphisms in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. **The Journal of Seroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.105, n. 1, p. 176-180, june/July. 2007.

- (28) MARIOLI, D. J.; et al. Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Fertility Sterility**, v.92, n. 2, p. 648-652, august. 2009.
- (29) PINHEIROAS, CLAPAUCH R. Importância da Dosagem da 17OH-Progesterona na Síndrome dos Ovários Policísticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n.4, p. 361-368, agosto.2001.
- (30) 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 e Metabologia**, v.55, n. 1, p. 6-15, fevereiro. 2009.
- (31) SILVA, R. C.; PARDINI, D. P.; KATER, C. E. Síndrome do ovários policísticos, síndrome metabólica, risco cardiovascular e o papel dos agentes sensibilizadores e da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.50, n. 2, p. 281-290, abril. 2006.
- (32) RIBEIRO, A.L. **Mieloperoxidase e síndrome dos ovários policísticos**. 2010. 63f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, São Paulo, 2010.
- (33) TALBOTT, E. O.; et al. The relationship between C-reactive protein and carotid intima-media wall thickness in middle-aged women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.12, p. 6061-6067, december.2004.
- (34) ORIO, F.; e.t al. Early impairment of endothelial structure and function in Young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical – Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4588-4593, September. 2004.
- (35) KAYA, C.; AKGÜL, E.; PABUCCU, R. C-reactive protein and homocysteine levels are associated with abnormal heart rate recovery in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility Sterility**, v.94, n.1, p. 230-235, june.2009.
- (36) NACUL, A. P.; et. al. Nitric oxide and fibrinogen in polycystic ovary syndrome: associations with insulin resistance and obesity. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 133, n. 2, p. 191-196, August. 2007.