

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
FISIOLOGIA**

**VARIANTES GENÉTICAS DA CALPAÍNA-10 (CAPN-10) NUMA AMOSTRA DE
PACIENTES HIPERANDROGÊNICAS**

Lúcia Beatriz Fernandes da Silva Furtado

Orientadora: Prof. Dra. Poli Mara Spritzer

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz da Fonte Kohek

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas
Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor.**

Porto Alegre, Junho de 2005.

Senhor!...

*Faze-me perceber que o trabalho do bem
me aguarda em toda parte.*

*Não me consintas perder tempo,
através de indagações inúteis.*

*Lembra-te, por misericórdia, que estou no caminho
da evolução, com os meus semelhantes, não para
consertá-los e sim para atender à
minha própria melhoria.*

*Induza-me a respeitar os direitos alheios a fim
de que os meus sejam preservados.*

*Dá-me consciência do lugar que me compete,
para que não esteja a exigir da vida
aquilo que não me pertence.*

*Não me permitas sonhar com realizações
incompatíveis com os meus recursos,
entretanto, por acréscimo de bondade,
fortalece-me para a execução das pequeninas
tarefas ao meu alcance.*

*Apaga-me os melindres pessoais, de modo que não
me transforme em estorvo diante dos irmãos,
aos quais devo convivência e cooperação.*

*Auxilia-me a reconhecer que cansaço e dificuldades não podem converter-me em
pessoa intratável, mas mostra-me, por piedade, quanto posso fazer
nas boas horas, usando paciência e coragem,
acima de quaisquer provações que
me atinjam a existência.*

*Concede-me forças para erradicar a paz e o amor que nos ensinaste.
E, sobretudo, Senhor, perdoa as minhas fragilidades e sustenta-me a
fé para que eu possa estar sempre em Ti,
servindo aos outros.*

Assim seja.

MEIMEI.

Orientadora:

Professora Dra. Poli Mara Spritzer

Professora Titular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Coordenadora da Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Co-orientadora:

Professora Dra. Maria Beatriz da Fonte Kohek

Professora Adjunta do Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas, Porto Alegre. Colaboradora do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Programa de Núcleos de Excelência – CNPq
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico – CNPq
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS
- Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – PROPESQ/UFRGS

Agradecimentos

- À Deus pelo dom da vida e por guiar meus passos ao longo desta caminhada;
- Aos meus Pais, os grandes mestres da minha vida, que sempre souberam orientar-me para que eu tomasse atitudes de uma pessoa digna de respeito e honestidade;
- Ao meu esposo João Carlos Furtado, pelo apoio e compreensão, que sempre soube me dar força para que eu persistisse neste caminho e por compreender os motivos dos momentos de minha ausência;
- A minha filha Júlia por compreender as horas que estive ausente. Perdoa-me;
- A Dra. Ilma Simoni Brum toda a minha gratidão e o reconhecimento àquela que conduz com humildade e maestria a arte de ensinar;
- Aos colegas de Laboratório, Adriane Pozzobon, Débora Morsch, Isabel Oliveira, Rafael Orcy, Rodrigo Cericato, pela acolhida carinhosa que me dedicaram todo o tempo e a grande amizade;
- A Denusa Wiltgen pela grande ajuda nas análises estatísticas obtidas neste trabalho;
- A Lívia Mastella por trabalharmos juntas nas etapas deste trabalho e a amizade;
- A Miriam Sant`Helena pela recepção e convívio agradável;

- A Iracema Vera Soares e Idelma Oliveira Pithan pelo empenho em prepararem todo o material para os experimentos deste trabalho;
- Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por possibilitarem a coleta de material de sangue, para a realização deste trabalho;
- À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia pelo apoio e oportunidade de ingresso.

A todos, meu muito Obrigado.

Agradecimento Especial

Às minhas orientadoras

*Dra. Poli Mara Spritzer
Dra. Maria Beatriz da Fonte Kohek*

Gosto de gente com a cabeça no lugar, de conteúdo interno, idealismo nos olhos e dois pés no chão da realidade.

Gosto de gente que ri, chora, se emociona com uma simples carta, um telefonema, uma canção suave, um bom filme, um bom livro, um gesto de carinho, um abraço, um afago.

Gente que ama e curte saudades, gosta de amigos, cultiva flores, ama os animais, admira paisagens, poeira e escuta.

Gente que tem tempo para sorrir bondade, semear perdão, repartir ternuras, compartilhar vivências e dar espaço para as emoções dentro de si, emoções que fluem naturalmente de dentro do seu ser!

Gente que gosta de fazer coisas que gosta, sem fugir de compromissos difíceis e inadiáveis, por mais desgastantes que sejam.

Gente que colhe, orienta, se entende, aconselha, busca a verdade e quer sempre aprender, mesmo que seja de uma criança, de um pobre, de um analfabeto.

Gente de coração desarmado, sem ódio e preconceitos baratos, com muito amor dentro de si.

Gente que erra e reconhece, cai e se levanta, apanha e assimila os golpes, tirando lições dos erros e fazendo redentora suas lágrimas e sofrimentos.

Gosto muito de gente assim... e desconfio que é deste tipo de gente que você é e que Deus também gosta!

Muito obrigada por depositarem em mim toda a sua confiança.

Sumário

| | |
|---|----|
| AGRADECIMENTOS..... | 5 |
| AGRADECIMENTOS ESPECIAIS..... | 7 |
| RESUMO..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 14 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 15 |
| LISTA DE TABELAS..... | 16 |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Variações polimórficas no genoma humano..... | 18 |
| 1.2 Análise de SNP's em doenças complexas..... | 20 |
| 1.3 Resistência à insulina..... | 22 |
| 1.4 Síndrome dos ovários policísticos..... | 29 |
| 1.5 Genes candidatos da resistência à insulina..... | 35 |
| 1.6 Calpaína-10..... | 36 |
| | |
| 2 OBJETIVOS..... | 42 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 42 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 42 |
| | |
| 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Delineamento experimental..... | 43 |
| 3.2 Pacientes..... | 43 |
| 3.2.1 Critérios clínicos para o diagnóstico etiológico..... | 43 |
| 3.2.2 Avaliação clínica..... | 44 |
| 3.2.3 Avaliação laboratorial hormonal..... | 45 |
| 3.2.4 Avaliação laboratorial metabólica..... | 46 |
| 3.3 Avaliação molecular..... | 46 |
| 3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos..... | 46 |
| 3.3.2 PCR (Polimerase chain reaction)..... | 47 |
| 3.3.3 PCR alelo-específico (Teste de AMRS)..... | 50 |
| 3.4 Análise estatística..... | 53 |
| | |
| 4 RESULTADOS..... | 54 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 73 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 85 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |

Resumo

A síndrome dos ovários policísticos atinge 5 - 10% das mulheres em idade fértil e mais de 40% destas pacientes apresenta obesidade e resistência insulínica, o que aumenta o risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Numerosos genes poderiam contribuir para o desenvolvimento do DM2 e outras alterações metabólicas. Dentre estes o gene da calpaína-10 (CAPN-10), tem sido associado com DM2 em populações mexicano-americanos, e em duas populações do Norte da Europa (Finlândia e Alemanha).

No presente estudo analisamos o genótipo de 96 pacientes hiperandrogênicas reunidas em dois grupos: Síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e Hirsutismo idiopático (HI), com relação à frequência de quatro polimorfismos do gene da CAPN-10 (SNP-44, 43, 19 e 63). Foram ainda realizadas análises de associação entre a frequência alélica dos polimorfismos e características clínicas das pacientes, com ênfase na obesidade e resistência insulínica. A variação genética da CAPN-10 foi avaliada a partir do DNA genômico por amplificação pela Polimerase Chain Reaction (PCR) e PCR-alelo

específico (Teste de AMRS) dos fragmentos que contém os polimorfismos do gene da CAPN-10.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs 44, 43, 19 e 63 entre os grupos PCOS e HI. Por outro lado, a comparação das características clínicas dos dois grupos mostrou que o alelo Ins do SNP-19 da CAPN-10 tendeu a ser mais freqüente entre as pacientes PCOS estratificadas para sobrepeso e obesas ($p \leq 0,05$). Não houve diferença na comparação das características clínicas avaliadas e a frequência alélica para os SNPs 43 e 63. A análise da amostra total de pacientes hirsutas, ou seja, pacientes com PCOS e HI agrupadas não evidenciou diferença entre a frequência alélica das variantes genéticas estudadas para a CAPN-10 e a presença de resistência insulínica. Tendo em vista o efeito modesto dos SNPs 44, 43, 19 e 63 avaliados isoladamente nestas pacientes, estudos adicionais serão necessários avaliando a frequência desses polimorfismos na população do Sul do Brasil.

Abstract

The polycystic ovary syndrome affects 5% to 10% of women in fertile age, and more than 40% of these patients present obesity and insulinic resistance, which increases the risk of developing type 2 diabetes mellitus (DM2). Numerous genes could contribute toward developing the DM2 and other metabolic alterations. Among them, the calpain-10 gene (CAPN-10) has been associated with DM2 in Mexican-American populations, and in two populations in Northern Europe (Finland and Germany).

In the present paper we analyze the genotype of 96 hyperandrogenic patients split into two groups: Polycystic ovary syndrome (PCOS) and idiopathic Hirsutism (IH), with regard to the frequency of four polymorphisms of the CAPN-10 gene (SNP-44, 43, 19 e 63). Other analyses include the association between the allelic frequency of polymorphisms and the clinical characteristics of the patients, with emphasis on obesity and insulinic resistance. The CAPN-10 genetic variation was evaluated from the genomic DNA by amplification through the Polimerase Chain Reaction (PCR) and specific allele-PCR (AMRS test) of the fragments that contain the CAPN-10 gene polymorphisms.

Our results suggested that there was no difference between the genotypic and allelic frequencies of the SNPs 44, 43, 19 e 63 within the PCOS IH groups. On the other hand, the comparison between the clinical characteristics of the two groups showed that the allele Ins of SNP-19 of CAPN-10 tended to be more frequent within PCOS patients stratified for overweight and obese ($p \leq 0,05$). There was no difference in the evaluated clinical characteristics and the allelic frequency for the SNPs 43 and 63. The analysis of the whole sample of hirsute patients, i.e., patients with grouped PCOS and IH did not evidence any difference between the allelic frequency of the studied genetic variants for CAPN-10 and the presence of insulinic resistance. In view of the modest effects of the SNPs 44, 43, 19 e 63 evaluated in isolated manner in these patients, further study will be needed to evaluate the frequency of such polymorphisms in the population of South Brazil.

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| A | adenosina |
| C | citosina |
| Ca ² | cálcio |
| cDNA | ácido desoxirribonucléico complementar |
| dATP | desoxi adenosina trifosfato |
| dCTP | desoxi citosina trifosfato |
| dGTP | desoxi guanina trifosfato |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| DM2 | diabetes mellitus tipo 2 |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| dNTps | desoxinucleotídeos |
| dTTP | desoxi timidina trifosfato |
| EDTA | tetra-acetato de etilenodiamina |
| EP | erro padrão da média |
| FSH | hormônio foliculo estimulante |
| G | guanina |
| Kb | kilo bases |
| LH | hormônio luteinizante |
| M | marcador de peso molecular |
| m | molar |
| mg | miligrama |
| MODY | diabete do adulto com início na juventude |
| mRNA | ácido ribonucléico mensageiro |
| NIDDM | diabete melito não-insulino-dependente |
| pb | pares de base |
| PCOS | síndrome dos ovários policísticos |
| PCR | reação em cadeia de polimerase |
| RFLP | polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição |
| RNA | ácido ribonucléico |
| rpm | rotações por minuto |
| RT-PCR | reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa |
| SHBG | globulina ligadora de hormônios sexuais |
| T | timidina |
| µg | micrograma |
| µl | microlitro |
| µm | micrograma |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Produtos de PCR do SNP 44 do gene da CAPN-10..... | 56 |
| Figura 2 – Produtos de PCR do SNP 43 do gene da CAPN-10..... | 57 |
| Figura 3 – Produtos de PCR do SNP 19 do gene da CAPN-10..... | 57 |
| Figura 4 – Produtos de PCR do SNP 63 do gene da CAPN-10..... | 58 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Características dos primers para amplificação de DNA..... | 49 |
| Tabela 2 – Características clínicas das pacientes..... | 55 |
| Tabela 3 – Análise da frequência genotípica dos polimorfismos do gene da CAPN-10 nas pacientes com PCOS e HI..... | 61 |
| Tabela 4 – Frequência alélica..... | 63 |
| Tabela 5 – Frequência alélica do SNP-44..... | 66 |
| Tabela 6 – Frequência alélica do SNP-43..... | 67 |
| Tabela 7 – Frequência alélica do SNP-19..... | 69 |
| Tabela 8 – Frequência alélica do SNP-63..... | 70 |
| Tabela 9 – Frequência alélica versus resistência insulínica..... | 72 |

1 INTRODUÇÃO

O genoma humano consiste em grandes quantidades de ácido desoxirribonucléico (DNA), que contém em sua estrutura a informação genética necessária para especificar todos os aspectos que tornam o ser humano um organismo funcional. O genoma contém, pelas estimativas atuais, cerca de 30.000 genes, os quais são codificados no DNA constituído por organelas em forma de bastão chamadas cromossomos no núcleo de cada célula (Sharchan, 2002).

Nos últimos 20 anos, um grande progresso foi feito em nossa compreensão sobre a estrutura e a função dos genes e cromossomos em nível molecular. Estes avanços deveram-se em grande parte às aplicações de genética molecular e da genômica a muitas situações clínicas, fornecendo assim os instrumentos para um enfoque novo e diferente à genética médica, e provocando um enorme impacto na medicina e na nossa percepção da fisiologia humana (Griffilhs et al, 2000).

Um gene pode ser definido como um segmento de uma molécula de DNA que contém o código para a seqüência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica e as seqüências reguladoras necessárias para a sua expressão. A seqüência do DNA nuclear é quase 99,9% idêntica entre os seres humanos e a pequena fração de seqüências de DNA diferentes entre as pessoas é responsável pela variabilidade geneticamente determinada individualmente. Algumas diferenças de seqüências de DNA têm pouco ou nenhum efeito no fenótipo,

enquanto outras diferenças são diretamente responsáveis por doenças (Thompson, 1993).

A mutação é definida como qualquer mudança na seqüência de nucleotídeos ou arranjo do DNA. As mutações gênicas são mudanças na seqüência de DNA, que variam de apenas um único nucleotídeo às mudanças que podem afetar muitos milhares de pares de bases, mas sempre em uma escala muito pequena para ser detectada mesmo através de análise citogenética de alta resolução (Thompson, 1993).

1.1 Variações polimórficas no genoma humano

O estudo da variação da herança entre indivíduos, alavancado pelo Projeto Genoma Humano, revelou que os dois genomas que cada um carrega, herdado dos pais, freqüentemente diferem em apenas uma única base. A identificação de milhares destes polimorfismos de uma única base também chamados de SNPs cresceu cerca de 1 milhão de vezes e suas localizações foram determinadas com muita precisão ao longo do genoma. Atualmente, cerca de 1,42 milhões de SNPs são conhecidos e sua densidade é de 1 SNP a cada 1,91 kilobases. Isto significa que mais de 90% de qualquer seqüência com 20 kilobases contém um ou mais de um SNP (Chakravarti, 2001). Assim, quase todas as regiões genômicas, e conseqüentemente os genes humanos, são marcados por uma variação da seqüência.

O padrão de variação ao longo do genoma é um indicador sensível dos fatores históricos e biológicos que afetaram o genoma humano. Hoje sabemos que a média de variação no genoma completo é de 7,51 diferenças a cada 10 kilobases e que algumas regiões genômicas têm uma diversidade média maior ou menor (International SNP Map Working Group, 2001). Através das comparações entre os genomas percebe-se que estas variações podem determinar respostas diferentes nas funções bioquímicas e celulares.

No entanto, a principal contribuição dos SNPs está na avaliação das contribuições gênicas individuais nas doenças que tem uma base multigênica complexa. Estas variações nas seqüências genômicas também estão por trás da susceptibilidade ou proteção a várias doenças; da idade de início das manifestações e da gravidade dos sintomas, bem como da maneira como o organismo responde aos tratamentos. Desta forma estudos de comparação dos padrões e da freqüência de SNPs em pacientes e controles permitem identificar associações entre eles (Stoneking, 2001).

Por outro lado, alguns problemas podem limitar a eficiência dos estudos com SNPs, como o desconhecimento sobre a sua participação e efeitos bem como sua distribuição nas populações individuais, antes do estudo do seu envolvimento na doença (Chakravarti, 1999). Além disso, muitas doenças complexas surgem de diferenças quantitativas dos produtos gênicos e a tecnologia para o ensaio de milhares de SNPs em milhares de pacientes e controles ainda não estão completamente desenvolvidas (Risch, 1996; Lander,

1996; Collins, 1997). Por outro lado, as condições ambientais também podem exercer influência sobre a predisposição genética à determinada doença.

1.2 Análise de SNPs em doenças complexas

O uso adequado de métodos de pesquisa, combinando os aspectos moleculares, genéticos, bioquímicos, imunológicos, clínicos e estatísticos, permite detectar subgrupos que são condições clínicas de herança mendeliana, separando-se das doenças comuns multifatoriais (Griffilhs, 2000).

Os genes são responsáveis por dois grandes tipos de doenças: as doenças genéticas raras, que possuem uma hereditariedade mendeliana e as doenças complexas, poligênicas e multifatoriais. Entre as doenças monogênicas, as mutações penetrantes em um gene, com graves conseqüências sobre a função da proteína, explicam o aparecimento de uma síndrome genética grave, com segregação familiar. As doenças complexas são caracterizadas pela implicação de muitos genes (ditos de susceptibilidade) com agregação familiar, porém sem segregação mendeliana. Estes defeitos gênicos das doenças complexas não se localizam apenas nas regiões codificadoras dos genes, mas também sobre as regiões reguladoras (como nos promotores) com conseqüências diferentes sobre o nível de expressão de seus produtos. (Thompson, 1993)

A estratégia de estudo dos genes responsáveis nestes dois tipos de doenças genéticas é diferente. Enquanto nas doenças do tipo mendeliano aplica-

se em geral métodos de ligação em famílias (caso-controle), no tipo complexo se aplica a genética de associação em populações transversais.

A evolução dos métodos de pesquisa das doenças complexas nos últimos anos deve-se ao êxito do Projeto Genoma Humano cujo seqüenciamento permitiu o reconhecimento e descrição dos SNPs e, à abordagem da genética de populações (Collins, 1999). Os SNPs têm uma freqüência alélica maior que 1%, e neste sentido, diferem do que normalmente chamamos de mutação, que são substituições da seqüência nucleotídica com freqüência menor que 1%. Além disso, podem ser utilizados tanto como marcadores genéticos, devido à combinação de sua elevada freqüência de distribuição no genoma e a baixa taxa de mutação, ou como componentes de haplótipos complexos.

Do ponto de vista molecular, os SNP são substituições de nucleotídeos classificadas em duas formas: “wild type” ou selvagem e mutante. A detecção destas duas formas é realizada por métodos inespecíficos mais amplos como o seqüenciamento direto (manual ou automático) ou ainda por métodos específicos de screening como MS-PCR, ASO ou SNAPSHOT, utilizados geralmente em estudos de larga escala.

Quanto à localização nos genes, os SNPs podem estar tanto na região codificadora, e, portanto, implicados na expressão fenotípica, quanto nas regiões não codificadoras dos genes. Os SNPs mais freqüentes são os chamados “SNPs silenciosos” pois não alteram a seqüência protéica ou não se encontram na região codificadora dos genes. Estes podem não ter efeito direto sobre o fenótipo,

mesmo que esteja contido na região codificadora, porém podem estar em desequilíbrio de ligação com outro SNP responsável pelas alterações funcionais (Risch, 1996; Judson, 2000).

Além disso, recentemente, foram identificadas regiões descontínuas do genoma humano, mais suscetíveis ao desequilíbrio de ligação (“hot spots”) que representam os locais de preferência à ocorrência da recombinação meiótica. (Gabriel, 2002).

1.3 Resistência à insulina

O papel primordial da insulina é a manutenção do equilíbrio metabólico através da regulação da glicemia, favorecendo principalmente o transporte e a utilização da glicose e tendo como locais de ação principais o músculo, o fígado e o tecido adiposo.

Além desta ação, a insulina permite a reserva de nutrientes, a diferenciação e o crescimento celular pela estimulação da síntese de glicogênio, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, além da ativação de numerosas funções específicas.

Define-se como resistência à insulina quando a quantidade normal de insulina secretada pelo pâncreas não é capaz de produzir um efeito biológico suficiente para a manutenção da homeostase glicídica. De maneira a manter a glicemia normal, o pâncreas secreta uma quantidade adicional de insulina. O termo “insensibilidade à insulina” foi usado pela primeira vez em 1936 por

Himsworth para definir a resposta anormal obtida após a injeção de insulina em pacientes diabéticos obesos (Himsworth, 1936)

Em 1960, Yalow e Berson desenvolveram o radioimunoensaio, um método capaz de quantificar a insulina. Somente após o advento do radioimunoensaio foi possível mensurar a resistência à insulina. Nestes experimentos verificou-se que os indivíduos apresentavam níveis superiores à insulinemia normal. A resistência à insulina passou a ser definida como o estado que afeta células, tecidos, órgãos ou sistemas no qual são necessárias quantidades de insulina superiores à normal para manter a homeostase glicídica (Berson & Yalow, 1970).

Esta definição clássica, um pouco restritiva, deve ser ampliada no conjunto dos mecanismos que vão se opor às ações metabólicas e mitogênicas da insulina, a saber, à entrada de glicose na célula, à captação de aminoácidos, ao transporte iônico, ao armazenamento e utilização do glicogênio, à síntese e degradação de proteínas, ao metabolismo de lipídios, e ao crescimento ou à multiplicação celular que determina um aumento de até 100 vezes na atividade quinase dos substratos exógenos.

O receptor de insulina se autofosforila no resíduo Tyr⁹⁶⁰ do domínio justamembranoso e nos resíduos Tyr¹³²⁸ e Tyr¹³³⁴ da região carboxiterminal, denominados de “sítios menores”. Além disso, o receptor é também fosforilado por quinase Ser/Thr específicas nos resíduos Ser¹³⁰⁵, Ser¹³⁰⁶ Thr¹³⁴⁸ do domínio carboxiterminal, que se constituem nos sistemas de regulação da atividade enzimática.

Por sua função tirosinaquinase, o receptor de insulina constitui-se numa proteína essencial à transdução do sinal. Os fatores de origem genética ou reguladora que modificam a autofosforilação do receptor, sua síntese ou sua maturação, são considerados como mecanismos da resistência à insulina.

Ela deve igualmente ter em conta os dados fisiopatológicos atuais, notavelmente as anomalias primárias do sinal de insulina e, a nível pós-receptor, as alterações intrínsecas dos sistemas efetores e das vias intracelulares.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência à insulina é definida por valores do teste in vivo do clamp euglicêmico. Outros métodos podem ser utilizados como o teste de tolerância à insulina (TTI) ou o teste de tolerância à glicose (TTGIV) (Modelo mínimo de Bergman). O índice HOMA (homeostasis model assessment) apesar de ter pouco valor nos casos de hiperglicemia, pode ser utilizado como parâmetro adequado para estudos epidemiológicos (WHO, 1999).

Numerosas técnicas foram propostas para medir a sensibilidade à insulina (Scheen, 1995). Os métodos mais precisos são representados pelo clamp euglicêmico e pelo modelo mínimo de Bergman. No entanto, é necessário um treinamento técnico especial para sua aplicação e, portanto a utilização destes métodos se restringe aos centros especializados (Raynard, 1998).

Foram estabelecidas correlações entre estes métodos de referência e os índices antropométricos ou biológicos como as medidas basais de insulina e

glicose. No entanto, condições mínimas de validade destes índices devem ser observadas (Scheen, 1995).

Na população em geral a resistência à insulina está presente em 10 a 25% em função do índice de massa corporal (IMC) e na diabetes mellitus tipo 2 (DM2) sua prevalência se eleva à 84% (Akinmokum, 1992).

Além disso, a resistência à insulina é um componente importante de várias doenças complexas como a síndrome metabólica, obesidade e diabete, com mecanismos ainda não completamente conhecidos (Ovalle, 2002; Golstein, 2002).

A Síndrome dos ovários policísticos atinge 5 - 10 % das mulheres em idade fértil e mais de 40 % destas pacientes apresentam obesidade e resistência à insulina, o que implica no desenvolvimento do DM2 entre a 3^a. e a 4^a. década da vida. A natureza exata das relações entre hiperandrogenismo, distribuição da massa gorda e a resistência à insulina ainda não está completamente esclarecida. A associação entre a desordem do metabolismo dos carboidratos e hiperandrogenismo foi descrito em 1921 por Achard e Thiers e chamado de “diabetes das mulheres barbadas”. A presença freqüente de *Acanthosis nigricans* foi relatada em mulheres com hiperandrogenismo e DM2 por Kierrland et al, 1947. Em 1976, Kaln descreveu uma desordem afetando meninas adolescentes, designada como síndrome tipo A, na qual as pacientes apresentavam virilização, clitoromegalia, além de uma extrema resistência insulínica como no DM2. Em outro grupo identificou-se uma síndrome de resistência insulínica extrema em mulheres pós-menopáusicas com presença de *Acanthosis nigricans* e

características auto-imunes, chamado de síndrome tipo B. A causa determinava a presença de anticorpos anti-receptor de insulina. Em 1980, Burghen e cols. descreveram a associação entre hiperinsulinemia e PCOS sendo investigada as relações entre a insulina e a função gonadal. Estas pacientes apresentavam hiperinsulinemia após estímulo pela glicose comparada com mulheres controles, sugerindo a presença de resistência insulínica. Além disso, houve uma correlação entre insulina e níveis de androgênios nas pacientes hiperandrogênicas obesas. Apesar da presença de hiperinsulinemia refletir a resistência insulínica, a tolerância à glicose não foi investigada neste estudo (Dunaif et al, 1997).

Outras síndromes foram descritas apresentando características fenotípicas, como: *Acanthosis nigricans*, hiperandrogenismo, DM2 e resistência insulínica. Entre elas destacam-se: lipoatrofias (total e parcial), síndromes diabéticas, leprechaunismo, e síndrome Rabson-mendenhall. Estudos posteriores identificaram mutações no receptor de insulina como a causa de leprechaunismo, da síndrome de Rabson-Mendenhall e de alguns casos da síndrome tipo A (Dunaif et al, 1997).

A resistência insulínica é um importante defeito na patogênese de DM2. Estudos posteriores com mulheres pós-menopáusicas e história prévia de PCOS revelaram um aumento significativo na prevalência de DM2 e hipertensão.

A obesidade é uma doença metabólica complexa que em longo prazo traz complicações cardiovasculares, metabólicas, respiratórias, reumatológicas e

cutâneas. Na obesidade a resistência à insulina é variável e proporcional à quantidade de adiposidade visceral. Os mecanismos ativados implicam:

- (a) aumento dos triglicerídeos como um efeito deletério sobre os tecidos periféricos, especialmente ao nível das células β pancreáticas;
- (b) a liberação de ácidos graxos livres com a estimulação da PKC; e
- (c) a regulação negativa dos receptores de insulina (down regulation).

No DM2, a resistência à insulina se associa a um aumento progressivo da função das células β pancreáticas e ao aumento da produção hepática de glicose. A resistência à insulina é um componente essencial desta forma de diabetes, ocupando um lugar de destaque na história natural desta doença (Warram, 1990).

A resistência à insulina provavelmente representa o traço de união mais importante entre a obesidade e o desenvolvimento do DM2. Aparece precocemente antecedendo o aparecimento da hiperglicemia e tem um importante determinismo genético. Numerosos estudos atribuem à resistência insulínica um papel preditivo ao aparecimento do DM2. Os mecanismos fisiopatológicos são muito intrincados, notavelmente com outros defeitos característicos da DM2 como (a) a alteração progressiva da secreção de insulina e (b) a regulação do débito de glicose hepática. No DM2, os valores elevados de insulina correspondem a uma etapa de compensação da resistência à insulina por uma hipersecreção pancreática, e a posterior diminuição progressiva da insulinemia corresponde à uma etapa de deterioração progressiva da secreção pancreática de insulina. No momento do diagnóstico de DM2, considera-se que já tenha ocorrido 50% de destruição da capacidade secretora da célula β . Um dos primeiros sinais de

alteração pancreática é a perda da primeira fase da secreção de insulina, que aparece em presença de uma elevação moderada da glicemia (ao redor de 115 mg/dl^{-100x}) e se manifesta por um retardo da estimulação da secreção de insulina durante o teste de tolerância à glicose (OGTT), com uma hiperinsulinemia reativa. Nesta etapa do DM2, a resistência à insulina já está presente.

Ferrannini et al,1997 estudaram uma população de 1200 indivíduos não diabéticos e observaram uma correlação não linear (curva hiperbólica) entre a sensibilidade periférica à insulina e a secreção de insulina. A obesidade não modifica a forma desta curva de correlação, mas a desloca para cima indicando que no indivíduo obeso a manutenção da glicemia normal impõe uma secreção maior de insulina e, portanto, um stress da célula β pancreática. Nos indivíduos obesos, a prevalência da resistência à insulina e da hipersecreção pancreática é proporcional ao IMC. Assim, 60% dos indivíduos com IMC maior que 35 apresenta uma resistência à insulina (Ferrannini et al., 1997). No entanto, uma proporção importante de indivíduos obesos não apresenta resistência à insulina. Por outro lado, os indivíduos obesos com um IMC maior que 40 não são obrigatoriamente diabéticos, sugerindo, portanto uma grande variabilidade nos mecanismos pelos quais a obesidade intervem na expressão fenotípica dos genes de susceptibilidade ao DM2.

1.4 Síndrome dos ovários policísticos

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma das doenças endócrinas mais freqüentes em mulheres durante a fase reprodutiva, afetando 5-10% das mulheres neste grupo (Franks,1995; Legro, 1998; Knochenhauer , 1998; Dunaif, 1997). A apresentação clínica é bastante heterogênea podendo incluir hirsutismo e acne, oligo ou amenorréia e, conseqüentemente, anovulação e infertilidade, associados a concentrações aumentadas de androgênios circulantes. Os sintomas surgem geralmente após a menarca e anormalidades bioquímicas podem estar presentes quando ocorre a adrenerca. A característica comum é a parada da maturação folicular resultando no acúmulo de pequenos cistos foliculares e aumento do volume do estroma ovariano, levando ao surgimento de uma imagem característica à ultrassonografia (USG) (Strauss, 1999). Atualmente, o critério diagnóstico para a PCOS engloba a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: anovulação, hiperandrogenismo clínico ou hormonal e ovários policísticos à ultrasonografia. Além disso, devem ser excluídas outras doenças associadas ao hiperandrogenismo.(The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004)

A etiopatogenia da PCOS 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 a PCOS (Strauss, 1999).

Várias evidências indicam que a resistência à insulina e a disfunção das células beta do pâncreas estão associadas à PCOS (Dunaif, 1997; O'Meara, 1993). As conseqüências potenciais desta síndrome à longo prazo incluem o DM2, a hipertensão e a doença cardiovascular (Legro, 1999). Estas manifestações metabólicas são similares àquelas vistas em grupos para risco aumentado de DM2, assim como familiares de diabéticos e mulheres com diabetes gestacional. De fato, a freqüente concomitância de ovários policísticos e DM2 sugere a presença de determinantes etiológicos nestas duas condições. Existe uma elevada incidência de tolerância diminuída à glicose em mulheres com PCOS comparado com a população em geral e uma maior prevalência da morfologia ovariana policística em mulheres com diabetes gestacional.

A insulina e o fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1) aumentam a síntese dos androgênios pelas células da teca e amplificam as ações do LH (Barbieri, 1986). No entanto, o mecanismo pelo qual a insulina e o IGF1 promovem a esteroidogênese nas células ovarianas não está completamente elucidado.

A resistência à insulina causada por mutações que interferem na ligação ou na sinalização do receptor de insulina está associada à uma marcante hiperandrogenemia de origem ovariana (Moller, 1988). A intensa hiperinsulinemia destes estados leva à ativação dos receptores de IGF-1 e conseqüentemente a uma maior produção de androgênios como resultado da interação sinérgica entre a ação da IGF e do LH. A resistência à insulina em mulheres com PCOS pode ocorrer tanto nas obesas quanto nas pacientes com peso normal, embora o

impacto clínico seja maior nas obesas (Ehrmann et al 1999; Spritzer et al, 2001). No entanto, esta resistência raramente causa um aumento na concentração de insulina em níveis iguais aos encontrados nos indivíduos com mutação no receptor de insulina (Legro, 1998; Dunaif, 1997; O'Meara, 1993). Assim, não parece que uma ativação nos receptores de IGF-1 seja responsável pelo aumento da síntese de androgênios na PCOS.

As ações metabólicas e mitogênicas da insulina são mediadas através de vias pós-receptor distintas. Assim, uma resistência à insulina seletiva pode ser produzida experimentalmente, deixando as ações mitogênicas intactas. Esta hipótese de alterações tecido-específicas na ação da insulina tem suporte nas seguintes observações:

- 1) A Insulina pode modular a esteroidogênese estimulada pelas gonadotrofinas nas células da granulosa de mulheres com PCOS in vitro, apesar da presença de resistência à insulina in vivo (Willis, 1995; Willis, 1996).
- 2) Há evidência da biossíntese de androgênios nas células da teca estimulada pela insulina através de um mecanismo de transdução do sinal que envolve um mecanismo de sinalização diferente utilizando os mediadores inositolglicanos (Nestler, 1998).
- 3) Existem relatos da presença de defeitos seletivos em fibroblastos de pele de mulheres com PCOS que resultam em alterações metabólicas e não mitogênicas da ação da insulina (Dunaif, 1995).

O mecanismo de resistência à insulina na PCOS não é conhecido com exatidão. A ausência de mutações na região codificadora do receptor de insulina em pacientes com PCOS exclui efetivamente este gene como responsável pela resistência à insulina nesta patologia. Porém existem evidências de uma anormalidade fenotípica estável na fosforilação do receptor de insulina em células de mulheres com PCOS. Dunaif et al, 1995 identificaram um aumento da fosforilação de resíduos de serina da subunidade beta do receptor de insulina em cultura de fibroblastos de pele em 50% das mulheres com PCOS estudadas, comparadas com controles. A fosforilação do resíduo de serina reduz a habilidade da tirosina fosforilar um substrato artificial, sugerindo que esta alteração pode prejudicar a transdução do sinal, respondendo por um defeito pós-receptor da ação da insulina. Esta alteração poderia estar presente devido a uma variante da serinaquinase ou à ativação de uma quinase como resultado de um fator autócrino. A última idéia é consistente com relação à sugestão de que a resistência à insulina na PCOS é causada por anormalidades na modulação da ação da insulina pela adenosina (Ciaraldi, 1997; Ciaraldi, 2000). Este modelo de anormalidade na sinalização da insulina complementa a sugestão de que a fosforilação da serina da CYP17 aumenta a atividade liase (Zhang, 1995), ligando potencialmente as variações da ação da insulina e a biossíntese de androgênios a um mecanismo comum.

Os defeitos moleculares da ação da insulina na PCOS foram estudados em células de fibroblastos. Estes estudos demonstraram que não há mudança na ligação da insulina ou na afinidade do receptor. No entanto, em 50% dos

fibroblastos observou-se uma diminuição da autofosforilação (Dunaif, 1995). Não foram encontradas mutações no receptor de insulina nestas pacientes por análise do DNA genômico através de seqüenciamento direto (Sorbara, 1994). A análise da seqüência do domínio tirosinaquinase na subunidade beta do receptor de insulina também não revelou nenhuma mutação. Este achado foi confirmado por outros investigadores (Talbot, 1996). Estudos de imunoprecipitação sugerem que fatores extrínsecos ao receptor de insulina sejam responsáveis pela fosforilação excessiva de serina (Dunaif, 1995). A proteinaquinase C (PKC) surgiu como candidata à fator pontual da fosforilação da serina, sendo posteriormente descartada devido a ausência de fosfotreonina nos receptores de insulina de pacientes com PCOS (Chin, 1994). Além disso, o receptor de IGF-1, que é um conhecido substrato da PKC funciona normalmente nestas pacientes (Pillay, 1991). E finalmente, não há diferença de concentração de isoformas de PKC nos fibroblastos estudados comparados aos controles. Outras quinases candidatas incluem a caseínaquinase like-simile e a proteinaquinase dependente de AMPc. No entanto a caseínaquinase I-like fosforila o receptor de insulina estimulado pela insulina duas vezes mais que o receptor de insulina não estimulado e a fosforilação do receptor de insulina pela proteinaquinase dependente de AMPc ocorre de maneira indireta pois a subunidade beta do receptor de insulina não contém a seqüência de aminoácidos classicamente reconhecida por esta quinase (Dunaif, 1997; Rapuano, 1991; Roth, 1987).

Embora fibroblastos não sejam células-alvo clássicas para a insulina, os defeitos identificados nestes estudos refletem em mutações do receptor de

insulina (Taylor, 1992). Assim, a presença de um fator de fosforilação de serina em células cultivadas de pacientes com PCOS sugere que a fosforilação anormal do receptor de insulina é geneticamente programada. Além disso, parentes de primeiro grau de mulheres com PCOS podem ser resistentes à insulina, incluindo os homens, o que é um indicador de defeito genético. Estudos recentes com gêmeos (Jahanfar, 1997) e com famílias (Norman, 1996) também têm sugerido que na PCOS a resistência à insulina é um defeito genético. O impacto desta desordem sobre a função reprodutiva, confere à PCOS um risco maior para o desenvolvimento de tolerância diminuída à glicose e do DM2. No entanto, o mecanismo ainda não está esclarecido. Tem sido estabelecido, porém, que a resistência insulínica e os defeitos da secreção insulínica estão presentes em mulheres não-diabéticas com PCOS (Ehrmann, 2000; Colilla, 2001).

A PCOS e o DM2 exibem forte agregação familiar. A etiologia é multifatorial, e a susceptibilidade individual tem sido determinada pela ação de fatores genéticos e ambientais. Os estudos do gene da insulina são consistentes com a hipótese de que o efeito da susceptibilidade genética contribui para a sobreposição fisiológica e epidemiológica entre DM2 e PCOS. Baseado neste fato, qualquer gene que reconhecidamente tenha influência sobre a susceptibilidade ao DM2 merece avaliação como candidato a um envolvimento na PCOS.

1.5 Genes candidatos da resistência à insulina

Numerosos genes que poderiam contribuir para o desenvolvimento do DM2 e/ou de suas complicações foram isolados e caracterizados. Uma das abordagens para determinar quando estes candidatos influenciam a susceptibilidade ao DM2 é comparar a frequência dos marcadores entre grupos de pacientes e controles. A identificação de uma associação sugeriria que a variação genética neste gene poderia aumentar ou reduzir o risco do desenvolvimento da doença. No entanto, a ausência de associação não implica necessariamente na exclusão da contribuição de um gene em particular para o desenvolvimento daquela condição.

Entre os genes candidatos ao DM2 encontram-se aqueles presentes em diversas regiões genômicas identificadas pelos estudos de ligação, como 1q25.3 (genes da apolipoproteína A2, da piruvatoquinase hepática e do fator de transcrição LMX1), 2q37.3 (gene da calpaína-10), 3p24.1, 3q28, 10q26.13, 12q24.31 e 18p11.22. Dentre estes, o cromossomo 2q37.3 tem destaque especial pois nele está contido o gene da calpaína-10, primeiro gene identificado como responsável por uma forma de DM2. Este locus está presente numa grande região chamada NIDDM-1 (non-insulin dependent diabetes mellitus) descrita por Hanis em 1996.

1.6 Calpaína-10

Recentemente, tem sido enfatizada a importância biológica de várias proteinases nas funções celulares.

A calpaína foi originalmente caracterizada como uma endopeptidase neutra de cisteína ativada por cálcio com distribuição ubíqua em todas as células animais examinadas. Hoje se sabe que elas formam uma família constituída por pelo menos 6 membros. Esta família pode ser subdividida em dois grandes grupos com base em sua distribuição – ampla ou tecido-específica.

As Calpaínas são proteinases que modulam a atividade celular e que possuem em sua estrutura um domínio cisteína-proteinase combinado com uma calmodulina ligada ao $i[Ca^{2+}]$. Sua atividade em mamíferos é regulada pela concentração de $i[Ca^{2+}]$, participando também da sinalização intracelular mediada pelo $i[Ca^{2+}]$. No entanto, suas funções precisas in vivo, ainda não foram claramente identificadas, embora exista forte sugestão de seu envolvimento em funções celulares básicas e essenciais.

A existência de uma proteinase neutra dependente de $i[Ca^{2+}]$ em cérebros de ratos foi primeiro relatada em 1964. Esta proteinase foi chamada de calpaína pela sua dependência de $i[Ca^{2+}]$ e pela homologia de sua seqüência com o domínio protease da família da papaína (proteases de cisteína).

A família das calpaínas inclui isoformas com expressão ubíqua e tecido-específica, sendo as mais comuns a calpaína μ (calpaína I) e a calpaína m (calpaína II). Todas elas possuem subunidades reguladoras idênticas e distintas subunidades catalíticas, o que confere diferentes sensibilidades ao $i[Ca^{2+}]$.

As calpaínas catalisam a proteólise de numerosos e diferentes substratos associados à membrana, citosólicos e citoesqueléticos na resposta ao dano celular *in vivo* e *in vitro*. No sistema nervoso, por exemplo, a ativação da calpaína está associada ao dano neuronal na isquemia ou no derrame, nas doenças de Alzheimer e de Huntington, e na desmielinização na esclerose múltipla. Embora seu papel seja mais conhecido nas neuropatologias elas também catalisam uma variedade de respostas enzimáticas e estruturais às alterações do $[Ca^{2+}]_i$, incluindo os efeitos sobre a proliferação celular, diferenciação, adesão, migração, plasticidade sináptica e turnover protéico. Além disso, algumas calpaínas estão localizadas no núcleo utilizando diversos fatores de transcrição como substrato. Estes membros da família parecem conter seqüências de transporte nuclear não tradicionais evidenciados por experimentos de mutagênese direcionada no domínio I de sua estrutura que interferem com sua localização nuclear. Estes dados indicam que as calpaínas têm papéis importantes no compartimento nuclear muito embora pouco se saiba sobre os substratos específicos, bem como sobre a consequência funcional da sua atividade nuclear.

Estruturalmente as calpaínas são heterodímeros consistindo de uma pequena subunidade invariável e uma grande subunidade catalítica variável. Esta grande subunidade catalítica tem 4 domínios : domínio I, regulador amino terminal que é processado durante a ativação; domínio II, domínio proteolítico homólogo à papaína; domínio III, um domínio de união de função desconhecida; e o domínio IV, caracterizado pela presença do domínio de ligação semelhante à calmodulina dependente de $[Ca^{2+}]_i$.

A calpaína-10 (CAPN-10) é um membro da família das calpaínas (calcium-activated neutral proteases) de proteases de cisteína não lisossomal que catalisa a clivagem endoproteolítica do substrato específico envolvido com diversas funções celulares, incluindo a sinalização intracelular (Sreenan, 2001). A proteína possui 74,9 kDa, possui 672 aminoácidos e se expressa em muitos tecidos incluindo aqueles envolvidos com a patogênese do DM2 nas ilhotas pancreáticas, músculo esquelético e fígado. Este fato sugere que a calpaína esteja implicada na regulação da secreção e da ação da insulina e na produção de glicose hepática.

A calpaína-10 é um membro atípico da família, pois o domínio IV não se constitui no clássico domínio calmodulina-símile, mas contém uma região carboxiterminal divergente. Sua organização é semelhante a da calpaína-5 e 6. Múltiplos transcritos alternativos deste gene codificam diferentes isoformas. Até hoje foram descritas 8 isoformas (a – h) devido ao splicing alternativo de seus exons. Estas diferentes isoformas tem tamanhos diversos sendo a maior delas a isoforma a constituída por 672 aminoácidos e a menor a isoforma h com 138 aminoácidos. (Goll, et al. 2003)

A calpaína-10 é codificada por um gene que está localizado no braço longo do cromossomo 2 (2q37.3). O gene propriamente dito tem 31 kb e é constituído por 15 exons e 14 íntrons (Goll, et al. 2003).

Em 1996, Hanis et al examinaram o genoma humano para genes de susceptibilidade ao DM2 utilizando a análise de ligação como método num grupo de 330 pares de irmãos americanos de origem mexicana. Neste estudo, relataram

uma evidência de associação entre o DM2 e um locus no cromossomo 2q37, chamado NDDM1. Em 1999, Cox et al descreveram uma abordagem estatística para a avaliação da interação entre regiões separadas do genoma. Neste estudo foi demonstrada uma interação entre os genes do cromossomo 2 (NIDDM1) e o cromossomo 5 (no qual se encontra o gene da CYP19) que teria uma contribuição à susceptibilidade ao DM2 entre mexicanos-americanos do condado de Starr, Texas, EUA. Posteriormente, foi proposto um estudo em modelo animal para indicar as interações epistáticas entre estes genes. Para a análise do papel da insulina na via de sinalização e a alteração da função das células beta observadas no DM2, Kido et al (2000) produziram camundongos transgênicos com as mutações nulas em heterozigose no gene do receptor de insulina e nos genes do IRS-1 e/ou do IRS-2. Os resultados revelaram interações poligênicas e geneticamente heterogêneas, acentuando sua importância na patogênese do DM2. Este mecanismo de defeitos cumulativos tornou-se uma hipótese de trabalho viável e aplicável nas doenças complexas poligênicas com transmissão não-mendeliana.

Em 2000, Horikawa et al realizaram um estudo detalhado da região NIDDM-1 que conduziu à descoberta do gene da calpaína-10 (CAPN10) que codifica uma cisteína-protease (Horikawa, Oda et al. 2000). A genotipagem desta região realizada através dos diversos SNPs e o mapeamento do intervalo candidato à DM2 revelou um polimorfismo – UCSNP-43 (G/A) associado ao DM2. Como isoladamente o UCSNP-43 não explicava a evidência de 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 íntron 3), UCSNP-19 (2R/3R repetições de 32 pb no íntron 6) e UCSNP-63 (C/T no íntron 13). Uma combinação de dois haplótipos geralmente pela variação de 3 SNPs, designado por UCSNP 43, UCSNP 19 e UCSNP 63 conferem risco aumentado ao DM2. Todos os SNPs estão localizados na região intrônica da calpaína. Permanece incerto se a variante intrônica influencia a função do gene diretamente, ou se é um desequilíbrio de ligação com a função da variante. Preliminarmente, evidências sugerem que a variação do UCSNP 43 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 (Baier, et al. 2000). A homocigosidade para o alelo G do UCSNP 43 é parte do alto risco da combinação haplotípica, a qual é bastante raro em populações do Norte da Europa.

Além disso, 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 cujo efeito ainda não foi definido, mas que parece estar implicada na predisposição ao DM2 em algumas populações. Esta protease neutra cálcio-ativada coordena a ativação ou inibição de inúmeras proteínas implicadas na sinalização intracelular. Está também envolvida na proliferação, diferenciação (incluindo adipocítica) e nos mecanismos de secreção de insulina. No entanto, a razão para que alterações neste gene seriam relacionadas ao advento da hiperglicemia permanece obscura. As variantes genéticas descritas não são

localizadas em áreas codantes do gene, sendo impossível de se estabelecer uma relação causal entre elas e o DM2. Neste primeiro estudo, o risco atribuído para o DM2 pelo haplótipo 112/121 (substituição A-G/ UCSNP-43) foi de 14% para americanos de origem mexicana e de 4% para europeus (finlandeses e alemães). Sugeriu-se que esta variante seria implicada em uma redução do transporte da glicose a nível celular e que promoveria um aumento da lipogênese estimulada pela insulina (Hoffstedt, 2002). Apesar das evidências da associação deste gene com DM2 em algumas populações, é possível que ele seja apenas um marcador para a predisposição genética ao DM2, e que o verdadeiro gene causador (*NIDDM1*) esteja em uma região cromossômica próxima.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar as frequências genotípica e alélica dos SNP's 44, 43, 19 e 63 do gene da CAPN-10 em mulheres hiperandrogênicas.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar a frequência alélica dos SNP's estudados com:

- Variáveis antropométricas relacionadas com obesidade e distribuição central de gordura;
- Presença de resistência insulínica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Estudo transversal

3.2 Pacientes

Foram selecionadas 96 pacientes entre aquelas consultando por hirsutismo na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEG), 61 com diagnóstico de PCOS (grupo PCOS) e 35 portadoras de hirsutismo idiopático (HI) (grupo HI), de acordo com a rotina da UEG (Spritzer et al, 2000; 2001).

3.2.1 Critérios clínicos para o diagnóstico etiológico

Os critérios para o diagnóstico de PCOS foram: a) hirsutismo; b) um ou mais androgênios séricos aumentados; c) oligomenorréia e/ou anovulação crônica.

Os critérios para hirsutismo idiopático foram: a) ciclos regulares e ovulatórios; b) níveis de androgênios normais ou no limite superior do normal (valores $\leq 1,96$ DP da média observada numa amostra de mulheres normais).

Foram excluídas do estudo pacientes com outras doenças associadas ao hirsutismo como hiperplasia adrenal congênita – forma não clássica, síndrome de Cushing ou tumores virilizantes, hiperprolactinemia (níveis séricos de prolactina

maiores do que 20 µg/L em duas ocasiões diferentes), disfunção da tireóide; pacientes gestantes ou que estivessem usando anticoncepcionais ou outras formulações contendo hormônios.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e todas as pacientes assinaram termo de consentimento informado.

3.2.2 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada pela equipe médica da UEG e incluiu grau de hirsutismo aferido pelo score de Ferriman e Galway (1961) e medidas antropométricas, como peso, altura, circunferência da cintura e do quadril. Foram calculados o índice de massa corporal (IMC) e a relação cintura/quadril (RCQ).

O IMC correlaciona-se com o conteúdo de gordura corporal e foi usado para estimar sobrepeso e obesidade. O cálculo é feito através da fórmula: peso (Kg)/altura² (m²). O intervalo de IMC considerado normal (magras é menos de 18,5) está compreendido entre 18,5-24,9 Kg/m²; sobrepeso é definido quando o intervalo de IMC está entre 25-29,9 Kg/m². São consideradas obesas as pacientes com IMC > 30 (WHO, 1997). A Razão cintura-quadril (RCQ) foi calculada dividindo-se a medida da circunferência da cintura pela circunferência do quadril, sendo indicador de obesidade do tipo andróide o índice superior a 0,85 cm (Spritzer et al, 1997).

3.2.3 Avaliação laboratorial hormonal

Foi realizada entre o 2º e o 8º dia da fase folicular do ciclo menstrual, ou em qualquer dia nas pacientes amenorréicas. As coletas de sangue foram realizadas entre 8:00 e 10:00 horas na UEG do HCPA e as dosagens hormonais analisadas no Laboratório de Radioimunoensaio do HCPA e no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia do departamento de Fisiologia, utilizando kits comerciais de ensaio por imunoquimioluminescência e radioimunoensaio. Foram dosados os hormônios insulina (Ins), androstenediona (A), hormônio luteinizante (LH), testosterona total (TT), e SHBG (globulina ligadora de hormônios sexuais). O índice de androgênios livres (IALcor) foi calculado pela seguinte fórmula: $TT \text{ (ng/ml)} \times 3,467 / SHBG \text{ (nmol/l)}$. LH e FSH séricos foram medidos por ensaio imunométrico (Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles) com sensibilidade de 0,05 mUI/ml para LH, 0,1 mUI/ml para FSH e coeficiente de variação (CV) intra- e inter- ensaio de 3,6% e 6,7%, respectivamente para LH e 2,1% e 4,3% para FSH. A testosterona total foi medida por método de radioimunoensaio (RIA) (ICN, Costa Mesa, CA) com um CV intra- e inter- ensaio de 10% e 11,6%, respectivamente. A Androstenediona foi medida por método de RIA (DSL, Webster, Texas) com sensibilidade de 0,03 ng/ml e CV intra-ensaio de 4,3% e inter-ensaio de 6%. A SHBG foi dosada por ensaio imunométrico (DPC, Los Angeles, CA) com sensibilidade de 0,2 nmol/L e CV intra- e inter-ensaio de 6% e 8%. Os níveis séricos de insulina foram medidos por imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim) com uma sensibilidade de 0,20 µUI/ml e um CV intra- e inter-ensaio de 1,8% e 2,5%, respectivamente.

3.2.4 Avaliação laboratorial metabólica

As pacientes realizaram teste de sobrecarga de glicose com 75g e foi dosada a insulinemia e glicemia aos 0 e 120 minutos. O índice HOMA (*Homeostatic Model Assesment*) foi calculado multiplicando-se os valores de insulina basais ($\mu\text{UI/ml}$) pelos valores basais de glicose (nmol/l) e dividindo-se o produto por 22,5.

3.3 Avaliação molecular

3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

As amostras de DNA foram colhidas a partir de 4 ml de sangue periférico que foram colhidos em ácido diaminotetracético (EDTA, 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se dois volumes de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) com incubação à 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi então descartado e o botão de células brancas foi ressuspensão em 2,4 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 48 μl de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (*Sigma, St Louis, Mo, USA*), e 40 μl de proteinase K (10 ng/ml) (*Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA*). Este material foi incubado à 37°C por 18 horas. Após este período, foi adicionado 0,96 ml de solução saturada de cloreto de sódio (6M) agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos, seguido de centrifugação a 3000 rpm. O sobrenadante foi

transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo e em seguida lavado em etanol 70%, durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco à temperatura ambiente. Após o procedimento, o DNA foi ressuspensão em tampão TE (10:01) (tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0) (Miller et al, 1988).

O DNA foi quantificado por absorvância de luz à 260/280 nm em espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

3.3.2 PCR (Polimerase Chain reaction)

A PCR é um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA definidas. O método é programado de maneira a permitir a amplificação seletiva de seqüência(s)-alvo de DNA específica(s) a partir de uma coleção heterogênea de seqüências de DNA.

Para permitir tal amplificação seletiva, alguma informação prévia, a respeito das seqüências-alvo, é necessária. Essa informação é utilizada para desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers* ou *amplificadores*), os quais são específicos para a seqüência e apresentam, com freqüência, cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão. Na presença de DNA-molde desnaturado, os *primers* se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares (*annealing*). Na presença de uma DNA-polimerase termostável apropriada (*Taq DNA polimerase*)

e de precursores de DNA (os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos, dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo e que irão se sobrepor.

O DNA genômico extraído do sangue periférico foi utilizado como substrato para amplificação por PCR dos fragmentos que contém os polimorfismos de interesse do gene da CAPN10 para os estudos por PCR alelo específico, e RFLP-PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores (*“primers”*) foram desenhados de acordo com a seqüência publicada e a abordagem metodológica. As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nestas amplificações e os respectivos tamanhos dos fragmentos se encontram na Tabela 1.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador (modelo PTC-100 ,MJ Research Inc., Watertown MA, USA), utilizando *primers* específicos para cada fragmento amplificado e com características próprias do método de identificação utilizado.

Tabela 1

Características dos primers sintetizados para amplificação de DNA seguindo o modelo proposto por Haddad et al, 2002.

| Gene | Localização | Seqüência 5'-3' | Concentração (nmol/L) | Fragmento |
|-------|--------------------------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| SNP44 | CAPN10- g.4841T/C | Sense comum: ctcacccacccaagtcaaggc Alelo 1(T): cagggcgctcacgcttgctat Alelo 2(C):gtgggcagaggactggggcgctcacgcttgcttc | 1000 1000 67 | Alelo 1:60 Alelo 2:75 |
| SNP43 | CAPN10- g.4852G/A | Anti sense comum: catccatagctccacgcctc Alelo 1(G): gcttagcctcaccttcaatc Alelo 2 (A): atcctcaccaagtcaagcgtagcctcaccttcaagt | 1000 1000 67 | Alelo 1:134 Alelo 2: 152 |
| SNP19 | CAPN10- g.7920inde132 bp | Sense: gtttggttctctcagcgtggag Anti sense: catgaaccctggcaggggtctaag | 400 400 | Alelo 1:155 Alelo2: 187 |
| SNP63 | CAPN10- g.1637C/T | Sense: aagggggccaggcctgacgggggtggCg Anti sense: agcactcccagctcctgatc | 400 400 | Alelo 1:162 Alelo 2:192 |

Foram genotipadas 4 variantes da Calpaína-10 (CAPN-10) utilizando-se 3 abordagens diferentes.

Os SNPs designados UCSNP43, UCSNP19 e UCSNP63 definem os haplótipos de alto risco para susceptibilidade ao diabetes em mexicanos-americanos e em duas populações do norte da Europa (Finlândia e Alemanha). O quarto SNP (UCSNP 44) foi incluído com base nos efeitos funcionais sobre a expressão da CAPN-10 (Horikawa, 2000) e nos dados que sugerem um papel

independente na susceptibilidade ao DM2 deste polimorfismo em famílias britânicas (Evans, 2001).

3.3.3 PCR alelo-específico (teste de ARMS)

Mutações conhecidas podem ser identificadas pelo desenho de três *primers*, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem (*wild type*) e um terceiro específico da região flanqueadora do exon. O desenho é feito de maneira que o *primer* específico para o alelo mutante termina com a base mutada na extremidade 3' e o *primer* específico para o alelo selvagem termina com a base do alelo selvagem em sua extremidade 3', funcionando como uma “sonda” alelo específica. Este método é usado para detectar mutações específicas e foi chamado de sistema de amplificação de mutação refratária (ARMS).

Os SNP 43 e SNP44 foram tipados usando esta metodologia empregando dois *primers* alelo específico que se diferenciam pelo tamanho pela inserção de uma cauda à posição 5' do *primer* específico para o alelo mutante e um *primer* comum. Estes *primers* alelo específico também apresentam trocas de nucleotídeos que aumentam sua especificidade e as concentrações foram ajustadas para compensar as diferenças sobre as eficiências das duas amplificações devido à diferença na dimensão dos *primers* (Tabela 1). Os SNP's 44 e 43 foram analisados nas seguintes condições: em um volume de 50 µl contendo 0,2 U Taq Polimerase, 200 µmol de cada trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP); 1X tampão de PCR (16 mmol/L (NH₄)₂ SO₄; 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8,4; 0,01% Tween 20);

aproximadamente 50 ng DNA; 1,5 mmol/L MgCl₂ e 5% de dimetilsulfato de sódio (DMSO). As condições da PCR foram otimizadas e incluíram uma desnaturação inicial de 12 minutos à 96°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 96°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos (SNP 44) e anelamento à 56°C por 30 segundos (SNP 43), extensão à 72°C por 30 segundos e extensão final de 10 minutos à 72°C. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 3%, coradas com brometo de etídio e visualizadas e fotografadas à luz UV.

O SNP19, por se tratar de um polimorfismo de deleção/inserção de 2 ou 3 repetições de 32 pares de bases (pb), foi analisado diretamente após a amplificação por PCR, nas seguintes condições com os *primers* descritos na tabela 1. Em um volume de 50 µl contendo 0,2 U Taq Polimerase, 200 µmol de cada trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP); 1X tampão de PCR (16 mmol/L (NH₄)₂ SO₄; 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8,4; 0,01% Tween 20); 50 ng DNA; e 1,5 mmol/L MgCl₂ e 5% de dimetilsulfato de sódio (DMSO). As condições da PCR foram otimizadas e incluíram uma desnaturação inicial de 12 minutos à 96°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 96°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e extensão final de 10 minutos à 72°C. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 3%, coradas com brometo de etídio e visualizadas e fotografadas à luz UV.

O SNP 63 foi tipado pelo método de RFLP-PCR (*restriction fragment length polymorphism*) usando a enzima de restrição *HhaI*.

Esta técnica identifica uma região do DNA amplificada por PCR através de análise dos padrões derivados de uma restrição enzimática. Os fragmentos gerados têm tamanhos diferentes que correspondem à localização dos sítios específicos de restrição para a enzima utilizada. A presença ou ausência de mutações (ou polimorfismos) numa destas regiões altera o padrão de clivagem enzimática determinando uma fácil diferenciação entre os alelos.

A PCR foi realizada em um volume total de 50 μ l contendo: 0,2 U Taq Polimerase; 200 μ mol de cada trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP); 1X tampão de PCR (16 mmol/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8,4; 0,01% Tween 20); 50 ng DNA; e 1,0 mmol/L MgCl_2 e DMSO 5%. As condições da PCR foram otimizadas e incluíram uma desnaturação inicial de 12 minutos à 96°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 96°C por 30 segundos, anelamento à 62°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e extensão final de 10 minutos à 72°C. A digestão com a enzima *HhaI* foi realizada pela incubação do produto de PCR com 3U de enzima à 37°C por 2 horas. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 3%, coradas com brometo de etídio e visualizadas e fotografadas à luz UV.

3.4 Análise estatística

As variáveis foram apresentadas como média e desvio padrão (DP) ou como valores absolutos e percentuais. As médias foram comparadas pelo teste “t” de Student e variáveis qualitativas pelo teste do Qui-quadrado com correção de Yates. Considerou-se o nível de significância como $p < 0,05$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Statistical Package for Social Sciences, versão 10.01 (SPSS, Chicago, IL, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas das pacientes estudadas

As características clínicas e metabólicas dos grupos de pacientes com PCOS e HI estão apresentadas na tabela 2. Os dois grupos diferem quanto à idade, sendo que o grupo HI apresenta idade maior que o grupo PCOS ($p < 0,001$).

Em relação ao IMC e a medida da cintura observamos valores mais elevados no grupo PCOS ($p = 0,012$ e $p = 0,004$, respectivamente) comparados com o grupo HI. No entanto, a relação cintura/quadril não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,076$) entre os dois grupos.

Quanto à presença de resistência insulínica avaliada pelo índice HOMA ($\geq 3,8$) encontramos uma frequência maior no grupo PCOS (69%) comparado com HI (40%) ($p = 0,041$). No entanto, a frequência de pacientes com sobrepeso ou obesidade foi similar entre os grupos com PCOS (67%) e HI (54%) ($p = 0,163$).

Tabela 2: Características clínicas

| | PCOS n= 61 | HI n= 35 | p |
|---|-----------------------|---------------------|----------|
| Idade (anos) | 20,6 ± 5,9 | 27,2 ± 10,6 | < 0,01 |
| IMC (kg/m ²) ^a | 31,1 ± 8,5 | 26,7 ± 5,8 | 0,012* |
| Cintura (cm) ^a | 93,7 ± 21,2 | 80,9 ± 11,7 | 0,04* |
| Relação cintura/quadril ^a | 0,84 ± 0,12 | 0,81 ± 0,07 | 0,248 |
| Resistência insulínica (HOMA ≥ 3,8) ^b | 42 (69%) | 14 (40%) | 0,041* |
| Sobrepeso/obesas (IMC ≥ 25) ^b | 41 (67%) | 16 (52%) | 0,163 |

Dados foram expressos em média ± desvio-padrão

^aTeste t de Student

^b χ^2 com correção de Yates

4.2 Análise molecular dos polimorfismos SNP 44, SNP 43, SNP 19 e SNP 63 do gene da CAPN10

As amostras foram amplificadas por PCR conforme descrito em material e métodos e de acordo com a metodologia proposta por Haddad et al, 2002. As figuras 1, 2, 3 e 4 mostram a amplificação por PCR para cada um dos 4 SNPs estudados do gene da CAPN-10. Em cada gel representativo da amostra estudada, observam-se pacientes homocigóticas ou heterocigóticas para o alelo polimórfico.

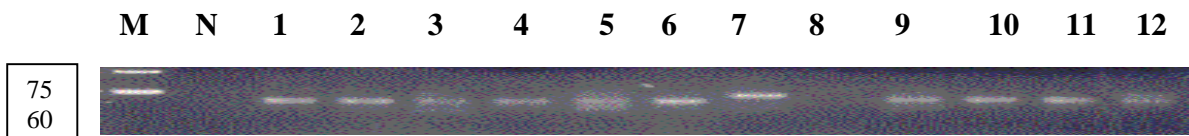


Fig 1- Amplificação por PCR do SNP 44 do gene da CAPN-10. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio sob luz UV apresentando os produtos de PCR do polimorfismo SNP 44 (4841T/C) do gene da CAPN-10. Os fragmentos de 60 pb representam o alelo T e os fragmentos de 75 pb representam o alelo C (polimórfico). As pacientes 1,2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 são homocigotas para alelo T; a paciente 7 é homocigota para o alelo C. M= marcador de peso molecular. N=controle negativo.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

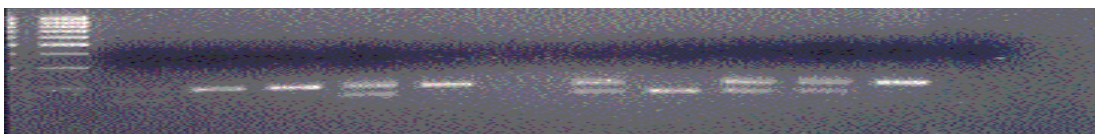


152
134

Fig 2 - Produtos de PCR do polimorfismo SNP 43 do gene da CAPN-10. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio sob luz UV apresentando os produtos de PCR do SNP 43 (4852G/A) do gene da CAPN-10. Os fragmentos de 134 pb representam o alelo selvagem e os fragmentos de 152 pb representam o alelo mutante (polimórfico). A paciente 8 é homocigota para alelo G; as pacientes 1, 2, 3, 5, 6 e 11 são homocigotas para o alelo A; e as pacientes 4, 9, 10, 12 e 13 são heterocigotas.

M= marcador de peso molecular.

M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



187
155

Fig 3 - Produtos de PCR do polimorfismo SNP 19 do gene da CAPN-10. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio sob luz UV apresentando os produtos de PCR do SNP 19 (7920indel132pb) do gene da CAPN-10. Os fragmentos de 155 pb representam o alelo Del (2 repetições com 32 pb) e os fragmentos de 187 pb representam o alelo Ins (3 repetições com 32 pb) (polimórfico). As pacientes 1, 2, 4,10, são homocigotas para alelo Del; a paciente

7 é homocigota para o alelo Ins. As pacientes 3, 6, 8 e 9 são heterocigotas. M= marcador de peso molecular. N=controle negativo.

M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

192
162



Fig 4 - Produtos de PCR do polimorfismo SNP 63 do gene da CAPN-10. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio sob luz UV apresentando os produtos de PCR do SNP 63 (1637C/T) do gene da CAPN-10. Os fragmentos de 162 pb representam o alelo C e os fragmentos de 192 pb representam o alelo T (polimórfico). As pacientes 1, 5, 9, 11 e 12 são homocigotas para alelo C; as pacientes 2, 4, 6, 7 e 10 são homocigotas para o alelo T. A paciente 3 é heterocigota.

M= marcador de peso molecular. N=controle negativo.

A partir destes resultados, foi analisada a distribuição dos genótipos em cada polimorfismo e sua frequência comparada entre os grupos PCOS e HI. Estes resultados são apresentados na tabela 3. As frequências estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (com exceção do SNP 44 no grupo PCOS). O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um modelo teórico utilizado na genética de populações que se baseia nas seguintes hipóteses: 1) a população tem a mesma probabilidade de se combinar e esta combinação é ao acaso; 2) a população é suficientemente grande, minimizando as diferenças existentes entre os indivíduos; 3) a população não está submetida a migração, mutação ou seleção (ou seja, não há perdas nem ganhos de alelos); e 4) as frequências gênicas e genóticas se mantêm constantes de geração a geração. Nestas circunstâncias, considera-se que a população se mantém em equilíbrio.

Em relação à análise dos genótipos dos polimorfismos do gene da CAPN-10 nos grupos estudados, observou-se uma maior frequência do genótipo AA do SNP 43 (homozigose polimórfica) no grupo PCOS (13%) em relação ao grupo HI (3%). No entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,14$). As frequências dos demais genótipos do SNP43 não foram diferentes estatisticamente na comparação entre os dois grupos.

Na análise dos genótipos do SNP 19 encontramos uma maior frequência do genótipo deletado (Del/Del) no grupo HI (23%) comparado com o grupo PCOS (7,0%). No entanto, as frequências dos genótipos do SNP 19 não foram diferentes estatisticamente na comparação entre os dois grupos ($p=0,71$).

A análise dos genótipos do SNP 63 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ($p=0,82$). Sendo assim, a distribuição dos genótipos do SNP 63 foi igual entre os dois grupos (tabela 3).

Tabela 3: Análise da frequência genotípica dos polimorfismos do gene da CAPN10 nas pacientes com PCOS e HI.

| | | PCOS | | HI | p |
|--------------|----------------|-------------|----------------------------|-----------|---|
| SNP44 | <i>TT</i> | 48 (0,81) | | 23 (0,68) | |
| | <i>TC</i> | 3 (0,05) | | 7 (0,20) | |
| | <i>CC</i> | 8 (0,14) | | 4 (0,12) | |
| | Total | 59 | 38,88; <0,001 ^a | 34 | 4,22; 0,06 ^a 0,52 ^b |
| SNP43 | <i>GG</i> | 25 (0,42) | | 20 (0,59) | |
| | <i>GA</i> | 27 (0,45) | | 13 (0,38) | |
| | <i>AA</i> | 8 (0,13) | | 1 (0,03) | |
| | Total | 60 | 0,028; 0,87 ^a | 34 | 0,726; 0,64 ^a 0,14 ^b |
| SNP19 | <i>Del/Del</i> | 4 (0,07) | | 8 (0,23) | |
| | <i>Del/Ins</i> | 34 (0,61) | | 15 (0,43) | |
| | <i>Ins/Ins</i> | 18 (0,32) | | 12 (0,34) | |
| | Total | 56 | 0,513; 0,47 ^a | 35 | 3,81; 0,051 ^a 0,71 ^b |
| SNP63 | <i>CC</i> | 34 (0,76) | | 25 (0,76) | |
| | <i>CT</i> | 10 (0,22) | | 5 (0,15) | |
| | <i>TT</i> | 1 (0,02) | | 3 (0,09) | |
| | Total | 45 | 0,067; 0,57 ^a | 33 | 1,02; 0,33 ^a 0,82 ^b |

Del = deleção (2 repetições de 32 pb); Ins= inserção (3 repetições de 32 pb)

^a χ^2 com correção de Yates –equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p^2+2pq+q^2=1,0$)

^b χ^2 com correção de Yates na comparação entre os dois grupos

As frequências alélicas de cada SNP estudado observadas no grupo total de pacientes e nos grupos PCOS e HI separadamente estão apresentadas na Tabela 4.

A análise da frequência alélica dos SNP 44 (T/C), SNP 43 (G/A), SNP 19 (Del/Ins) e SNP 63 (C/T), entre os grupos de pacientes estudadas, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Assim, comparando os dois grupos os alelos apresentam-se em frequências muito semelhantes.

Tabela 4 : Freqüência alélica

| Alelos | T | SNP 44 (n=89;178) | | | G | SNP 43 (n=90;180) | | | Del | SNP 19 (n=87;174) | | | C | SNP 63 (n=74;148) | | |
|--------|----------|----------------------|----|------|-----|----------------------|----|----|-----|----------------------|-----|------|-----|----------------------|----|----|
| | | % | C | % | | % | A | % | | % | Ins | % | | % | T | % |
| Total | 147 | 82,5 | 31 | 17,5 | 122 | 68 | 58 | 32 | 67 | 38,5 | 107 | 61,5 | 129 | 87 | 19 | 13 |
| HI | 48 | 80 | 12 | 20 | 45 | 75 | 15 | 25 | 25 | 40 | 37 | 60 | 51 | 88 | 7 | 12 |
| PCOS | 99 | 84 | 19 | 16 | 77 | 64 | 43 | 35 | 42 | 37,5 | 70 | 62,5 | 78 | 87 | 12 | 13 |
| | χ^2 | 0,42 | | | | 2,15 | | | | 0,134 | | | | 0,05 | | |
| | P | 0,535 | | | | 0,176 | | | | 0,747 | | | | 1,000 | | |

Comparamos as características clínicas dos dois grupos em relação aos alelos de cada polimorfismo estudado. Estes resultados estão apresentados nas tabelas, 5, 6, 7 e 8.

A análise das características clínicas dos grupos com relação ao SNP 44 (tabela 5) revelou uma diferença estatisticamente significativa com relação à média da medida da cintura ($p=0,007$) no grupo HI, enquanto que no grupo PCOS nenhum parâmetro apresentou diferença estatisticamente significativa.

A análise da presença de resistência insulínica avaliada pelo índice HOMA não apresentou diferença entre os alelos em nenhum dos dois grupos. No entanto, ao estratificarmos os grupos para presença de sobrepeso ou obesidade, observamos uma diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos do SNP 44 no grupo HI. O alelo C é mais frequente que o alelo T entre as pacientes com sobrepeso ou obesas do grupo HI. No grupo PCOS, estratificado para o IMC, não foi observada diferença significativa na frequência alélica do SNP 44.

A análise das características clínicas dos grupos com relação ao SNP 43 (tabela 6) também revelou uma diferença estatisticamente limítrofe com relação à média da medida da cintura ($p=0,05$) apenas no grupo HI.

A análise da presença de resistência insulínica avaliada pelo índice HOMA e a estratificação dos grupos para a presença de sobrepeso ou obesidade não apresentaram diferença entre os alelos do SNP 43 em nenhum dos dois grupos.

Tabela 5: Frequência alélica do SNP44

A.

| SNP 44 | PCOS | | | HI | | |
|-----------|--------------|--------------|-------|-------------|-------------|--------|
| | T | C | p | T | C | p |
| Idade | 20,66 ± 6,11 | 20,68 ± 4,32 | 0,985 | 25,9 ± 5,66 | 30,1 ± 5,62 | 0,161 |
| IMC | 30,5 ± 7,9 | 32,4 ± 10,7 | 0,47 | 25,9 ± 5,66 | 30,1 ± 5,62 | 0,029* |
| Cintura | 93,6 ± 19,2 | 88,8 ± 29,8 | 0,42 | 70,7 ± 11,9 | 89,0 ± 7,3 | 0,007* |
| Cint/quad | 0,84 ± 0,11 | 0,81 ± 0,19 | 0,30 | 0,81 ± 0,07 | 0,82 ± 0,05 | 0,80 |

*Teste t de Student $p < 0,05$

B.

| SNP44 | | PCOS | | | HI | | |
|------------------------|------------|------|----|------|----|----|--------|
| | | T | C | p | T | C | p |
| Resistência insulínica | HOMA < 3,8 | 31 | 7 | | 30 | 4 | |
| | HOMA ≥ 3,8 | 68 | 12 | 0,63 | 18 | 8 | 0,06 |
| Sobrepeso/obesas | IMC < 25 | 43 | 7 | | 24 | 2 | |
| | IMC ≥ 25 | 56 | 12 | 0,59 | 22 | 10 | 0,028* |

χ^2 com correção de Yates

Tabela 6: Frequência alélica do SNP43

A.

| SNP 43 | PCOS | | | HI | | |
|-----------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|-------|
| | G | A | p | G | A | p |
| Idade | 20,4 ± 5,86 | 20,8 ± 5,98 | 0,67 | 27,3 ± 5,86 | 25,4 ± 5,79 | 0,68 |
| IMC | 30,1 ± 8,7 | 32,6 ± 8,3 | 0,13 | 27,2 ± 5,7 | 25,4 ± 5,8 | 0,29 |
| Cintura | 91,1 ± 21,3 | 97,3 ± 20,7 | 0,14 | 82,8 ± 11,7 | 75,8 ± 10,9 | 0,05 |
| Cint/quad | 0,82 ± 0,12 | 0,87 ± 0,13 | 0,08 | 0,82 ± 0,06 | 0,79 ± 0,07 | 0,192 |

*Teste t de Student p<0,05

B.

| SNP 43 | | PCOS | | | HI | | |
|------------------------|------------|------|----|------|----|---|-----|
| | | G | A | p | G | A | p |
| Resistência insulínica | HOMA < 3,8 | 27 | 11 | | 18 | 8 | |
| | HOMA ≥ 3,8 | 50 | 32 | 0,2 | 25 | 7 | 0,4 |
| Sobrepeso/obesas | IMC < 25 | 29 | 11 | | 18 | 8 | |
| | IMC > 25 | 40 | 32 | 0,17 | 25 | 7 | 0,4 |

χ^2 com correção de Yates

A análise das características clínicas dos grupos com relação ao SNP 19 (tabela 7) não apresentou diferença estatisticamente significativa em nenhum parâmetro nos dois grupos, bem como a presença de resistência insulínica avaliada pelo índice HOMA. No entanto, observamos diferença na frequência de indivíduos do grupo PCOS portadores do alelo Ins entre as pacientes estratificadas para sobrepeso ou obesas que foi estatisticamente limítrofe ($p=0,05$).

A análise das características clínicas, presença de resistência insulínica e estratificação para sobrepeso ou obesidade com relação ao SNP 63 não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dois grupos (tabela 8).

Tabela 7: Frequência alélica do SNP19

A.

| SNP 19 | PCOS | | | HI | | |
|-----------|-------------|-------------|-------|--------------|-------------|------|
| | 2R | 3R | p | 2R | 3R | p |
| Idade | 19,8 ± 5,74 | 20,8 ± 5,86 | 0,375 | 26,78 ± 5,89 | 26,6 ± 5,82 | 0,6 |
| IMC | 29,2 ± 9,1 | 32,4 ± 8,3 | 0,06 | 26,8 ± 5,9 | 26,6 ± 5,8 | 0,9 |
| Cintura | 88,3 ± 20,3 | 91,9 ± 19,9 | 0,5 | 87,2 ± 15,5 | 93,4 ± 19,1 | 0,2 |
| Cint/quad | 0,82 ± 0,14 | 0,85 ± 0,12 | 0,23 | 0,82 ± 0,05 | 0,80 ± 0,07 | 0,21 |

Teste t de Student p<0,05

B.

| SNP 19 | | PCOS | | | HI | | |
|------------------------|------------|------|----|------|----|----|------|
| | | 2R | 3R | p | 2R | 3R | p |
| Resistência insulínica | HOMA < 3,8 | 17 | 21 | | 14 | 20 | |
| | HOMA ≥ 3,8 | 25 | 49 | 0,2 | 9 | 17 | 0,6 |
| Sobrepeso/obesas | IMC < 25 | 19 | 19 | | 10 | 18 | |
| | IMC ≥ 25 | 23 | 51 | 0,05 | 15 | 17 | 0,38 |

χ^2 com correção de Yates

Tabela 8: Frequência alélica do SNP63

A.

| SNP 63 | PCOS | | | HI | | |
|-----------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|------|
| | C | T | p | C | T | p |
| Idade | 20,8 ± 6,42 | 19,0 ± 3,78 | 0,2 | 26,6 ± 5,76 | 28,6 ± 6,59 | 0,13 |
| IMC | 31,5 ± 9,3 | 28,2 ± 8,0 | 0,25 | 26,6 ± 5,8 | 28,6 ± 6,6 | 0,38 |
| Cintura | 90,1 ± 19,9 | 87,4 ± 11,8 | 0,5 | 81,3 ± 11,7 | 83,6 ± 12,9 | 0,60 |
| Cint/quad | 0,86 ± 0,1 | 0,82 ± 0,09 | 0,20 | 0,82 ± 0,06 | 0,80 ± 0,03 | 0,72 |

Teste t de Student p<0,05

B.

| SNP 63 | | PCOS | | | HI | | |
|------------------------|------------|------|----|-----|----|---|-----|
| | | C | T | p | C | T | p |
| Resistência insulínica | HOMA < 3,8 | 57 | 9 | | 27 | 5 | |
| | HOMA ≥ 3,8 | 71 | 10 | 0,8 | 24 | 2 | 0,4 |
| Sobrepeso/obesas | IMC < 25 | 27 | 5 | | 23 | 3 | |
| | IMC ≥ 25 | 51 | 8 | 0,7 | 28 | 4 | 0,9 |

χ^2 com correção de Yates

Diante dos resultados obtidos, considerou-se conveniente analisar o grupo inteiro quanto à frequência alélica dos SNP 44, 43, 19 e 63 em relação à resistência insulínica. Assim, o grupo inteiro de pacientes foi estratificado utilizando a variável índice HOMA, considerando o valor de 3,8 como ponto de corte. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas nos dois grupos (tabela 9).

Tabela 9: Frequência alélica versus resistência insulínica

| Alelos | SNP 44 (n=89;178) | | | | SNP 43 (n=90;180) | | | | SNP 19 (n=87;174) | | | | SNP 63 (n=74;148) | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-------|----|------|----------------------|-------|----|------|----------------------|-------|-----|------|----------------------|-------|----|------|
| | T | % | C | % | G | % | A | % | Del | % | Ins | % | C | % | T | % |
| Total (n = 92; 184) | 147 | 82,5 | 31 | 17,5 | 122 | 68 | 58 | 32 | 67 | 38,5 | 107 | 61,5 | 129 | 87 | 19 | 13 |
| HOMA ≥ 3,8 (n = 36; 72) | 61 | 84,7 | 11 | 15,3 | 53 | 73,6 | 19 | 26,4 | 31 | 43,1 | 41 | 56,9 | 57 | 86,4 | 9 | 13,6 |
| HOMA < 3,8 (n = 56; 112) | 86 | 81,1 | 20 | 19,9 | 69 | 63,9 | 39 | 36,1 | 36 | 35,3 | 66 | 64,7 | 72 | 87,8 | 10 | 12,2 |
| χ^2 | | 0,384 | | | | 1,870 | | | | 1,074 | | | | 0,068 | | |
| p | | 0,688 | | | | 0,195 | | | | 0,344 | | | | 0,81 | | |

5 DISCUSSÃO

Hiperandrogenismo é o termo usado para descrever os sinais clínicos mais comuns (hirsutismo, acne e alopecia) em mulheres com níveis circulantes aumentados de androgênios ou alterações na sua ação sobre o folículo pilosebáceo. Nesta última situação, ocorre excessiva utilização dos androgênios pelo tecido cutâneo, apesar de suas concentrações circulantes serem normais (Serafini & Lobo, 1985; Oliveira et al, 2003). Assim, estas mulheres apresentarão manifestações isoladas de hiperandrogenismo, na presença de ciclos menstruais regulares, fertilidade preservada e níveis hormonais normais. Este quadro é denominado hirsutismo (ou acne) idiopático (Azziz et al, 2000). Na outra ponta do hiperandrogenismo, quando associado à níveis circulantes aumentados de androgênios, estes decorrem de alterações nos ovários ou adrenais com aumento na produção de androgênios (Spritzer et al, 2002). Várias etiologias estão relacionadas com o hiperandrogenismo de origem glandular, mas a condição mais freqüente em mulheres na idade reprodutiva é a síndrome dos ovários policísticos (PCOS), afetando 5-10% das mulheres nesta fase (American Association of Clinical Endocrinologists Medical). A apresentação clínica é bastante heterogênea podendo incluir

hirsutismo e acne, oligo ou amenorréia e, conseqüentemente, anovulação e infertilidade, associados a concentrações aumentadas de androgênios circulantes. Além disso, com freqüência observa-se a presença de resistência insulínica nestas pacientes (Dunaif et al, 1989; Ehrmann et al, 2005; Spritzer et al, 2001).

A resistência insulínica confere um risco maior para o desenvolvimento do DM2. Os estudos em famílias e com gêmeos monozigóticos indicam que o DM2 tem um importante componente genético (Kahn, 1994). Por outro lado, existe uma relação entre a PCOS e o desenvolvimento em longo prazo de doenças metabólicas como a tolerância diminuída à glicose, DM2 e dislipidemia (Wild, 1995; Dunaif, 1995). A tolerância diminuída à glicose e o DM2 são encontrados em até 40 a 45% das pacientes com PCOS (Legro et al, 1999; Ehrmann et al, 1999).

Enquanto a etiologia da PCOS ainda permanece desconhecida, evidências apontam para um papel importante da hiperinsulinemia, secundária à resistência insulínica, sobre a patogênese das anormalidades reprodutivas através da estimulação da produção ovariana de androgênios (Book e Dunaif, 1999). A hiperinsulinemia é também considerada fator de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose e doença arterial coronariana (Conway et al, 1992). Assim, os achados clínicos e bioquímicos do hiperandrogenismo nas pacientes com PCOS podem ser precursores ou simultâneos com os distúrbios metabólicos que terão um efeito principal sobre sua saúde a partir da 4^a. década de suas vidas (Dahlgren et al, 1992).

A obesidade tem sido observada em 30-50% das pacientes com PCOS, contribuindo para o aumento da probabilidade da ocorrência destes distúrbios metabólicos. Geralmente, o padrão de obesidade apresentado é “andróide” e reflete-se no aumento da circunferência da cintura, da relação cintura/quadril e outras mensurações da distribuição de gordura corporal. O padrão andróide da distribuição da gordura corporal está associado com a concentração de androgênios e lipoproteínas, sobre a tolerância à glicose, e sobre a secreção de insulina (Morales et al, 1996). É importante salientar que a resistência à insulina em mulheres com PCOS pode ocorrer tanto nas obesas quanto nas pacientes com peso normal (Nestler e Jakubowicz, 1997; Dunaif, 1989), embora o impacto metabólico seja maior entre as obesas (Legro et al, 1999; Ehrmann et al, 1999; Spritzer et al, 2001).

Em nosso estudo, as pacientes com PCOS eram mais jovens e apresentaram valores médios de IMC e da medida da cintura maiores, quando comparadas ao grupo HI. Além disso, o grupo PCOS apresentou também uma freqüência estatisticamente maior de sobrepeso e obesidade ($IMC \geq 25$) que o grupo HI. Estes dados são o reflexo do desenho experimental deste trabalho que foi o de um estudo transversal. Neste caso, as pacientes hirsutas que preenchiam os critérios de inclusão eram alocadas de forma seqüencial no estudo. Desta forma, como não houve pareamento dos grupos, as pacientes com PCOS acabaram sendo mais jovens e mais freqüentemente obesas que o grupo controle com HI. Além disso, as PCOS apresentaram médias de insulina e HOMA mais elevadas que as HI. Estas diferenças indicam exatamente este perfil de maior risco metabólico do PCOS e a relevância de pesquisas que

busquem identificar marcadores genéticos para os distúrbios metabólicos nestas pacientes. Se houvéssamos selecionado pacientes dos dois grupos com perfil antropométrico e metabólico mais homogêneo, poderíamos ter um viés na inclusão de indivíduos que não representam a realidade tanto para PCOS quanto para HI.

Por outro lado, a maioria dos trabalhos nesta área estabelece comparações entre grupos de risco e indivíduos saudáveis e não expostos a estes riscos como grupo controle. No entanto, no presente estudo, a idéia de se avaliar um grupo controle composto de mulheres com hirsutismo idiopático representa um modelo já validado na literatura a partir da experiência prévia do grupo de pesquisa (Spritzer et al, 2000; Frajndlich & Spritzer, 2005; Spritzer et al, 2005). Como já referido, as mulheres com HI correspondem a um grupo de pacientes hiperandrogênicas que não apresentam níveis circulantes elevados de hirsutismo, mas sim alterações nas ações e no metabolismo de androgênios no folículo piloso (Serafini & Lobo, 1983; Oliveira et al, 2003). Assim, estas mulheres tem ciclos regulares e ovulatórios, perfil hormonal e metabólico normal como outras mulheres saudáveis não-hirsutas mas consultam pelas mesmas queixas de hirsutismo que as pacientes com PCOS. Isso as torna um grupo adequado para os estudos envolvendo PCOS (Spritzer et al, 2001; Comim et al, 2004).

Tem sido proposto que variantes genéticas comuns podem contribuir de maneira significativa para a susceptibilidade genética à doenças, implicando diretamente como causa primária a variante menos freqüente. A utilidade

destes marcadores é determinada pela heterozigosidade na população e desta forma qualquer abordagem de descoberta de SNPs envolve tanto a seqüência de DNA quanto a determinação de sua freqüência alélica. As variantes mais relevantes são as localizadas nas regiões codificadora e reguladora dos genes, embora a região não codificadora do DNA também contenha seqüências importantes para a função reguladora. Os SNPs são geralmente usados em projetos de grande capacidade de processamento, obrigando a utilização de métodos de detecção apropriados para facilitar a análise de grande número de polimorfismos e de grande número de amostras de pacientes. Os estudos de associação buscam detectar diferenças nas freqüências destas variantes genéticas entre indivíduos afetados não relacionados e controles. Este método tem sido usado nas abordagens de genes candidatos e no mapeamento fino de genes de doenças em regiões identificadas pelas análises de ligação. Os estudos de associação genética podem ser diretos ou indiretos. Os estudos diretos testam a hipótese de que determinados SNPs são o fator causal na predisposição à susceptibilidade à doença quando a sua freqüência é significativamente maior nos indivíduos afetados versus não afetados.

O gene da calpaína-10 (CAPN-10), que codifica um membro da família de cisteína proteases, foi posicionalmente clonado dentro da região NIDDM1 (HoriKawa et al, 2000). Os estudos de associação usando marcadores intragênicos do gene CAPN-10 revelaram que diferentes alelos podem contribuir para a predisposição ao DM2 em diversas populações (HoriKawa et al, 2000; Garant t al, 2002), bem como modificar o processamento da pró-insulina e da secreção de insulina em indivíduos não diabéticos (Stumvoll et al,

2001). Embora a função da calpaína-10 no DM2 permaneça ainda desconhecida (Permut et al, 2000), o polimorfismo no íntron 3 do gene CAPN-10 (SNP-43) parece estar associado com níveis reduzidos de RNAm da CAPN-10 no músculo e com a resistência insulínica (Baier et al, 2000).

Desde a sua identificação e associação ao DM2, o gene da CAPN-10 vem sendo avaliado também em outros fenótipos e tratos como a PCOS, o hirsutismo idiopático (HI), a resistência à insulina, e os níveis de ácidos graxos livres, glicose e colesterol sérico. (Ehrmann et al, 2002; Gonzalez et al, 2002; Haddad et al, 2002; Rasmussen et al, 2002; Orho-Melander et al, 2002; Lynn et al, 2002; Daimon et al, 2002). O primeiro estudo do gene CAPN-10 em pacientes com PCOS, realizado no Reino Unido, forneceu a primeira evidência de seu envolvimento na susceptibilidade à síndrome. Neste estudo uma associação estatisticamente significativa ao SNP-44 foi identificada (Haddad et al, 2000). No entanto, o mesmo grupo em estudo posterior não confirmou seus achados preliminares numa análise mais extensa recentemente publicada (Haddad et al, 2002).

Por outro lado, Ehrmann et al, 2002 identificaram uma combinação de haplótipos (genótipo 112/121) que parece estar associada com um aumento de duas vezes do risco à PCOS em pacientes de origem africana-americana e caucasianas. Baseados nestes resultados preliminares, Gonzalez et al, 2002a relataram a associação de alelo do SNP-44 com PCOS na população espanhola a qual foi confirmada em estudo posterior desta vez apresentando uma correlação haplótipo-genótipo e estratificando os grupos com relação à

presença ou ausência de ovários policísticos à ultrassonografia (Gonzalez et al, 2002b).

No presente estudo analisamos o genótipo de 97 pacientes hiperandrogênicas reunidas em dois grupos, segundo critérios diagnósticos já validados: PCOS e HI. A frequência de quatro polimorfismos do gene CAPN-10 foi avaliada (SNP-44, SNP-43, SNP-19 e SNP-63) e a escolha dos mesmos foi baseada em estudos prévios já citados que mostraram algumas evidências sugerindo frequências de associação significativas para estes polimorfismos. Inicialmente, comparamos a distribuição dos genótipos em cada polimorfismo e avaliamos suas frequências. Com exceção do SNP-44, as frequências de todos os polimorfismos se encontravam em equilíbrio de acordo com Hardy-Weinberg. Nenhum polimorfismo apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Quanto à frequência alélica isoladamente também não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados. Nossos resultados, usando como grupo controle pacientes hirsutas com HI são semelhante aos observados por outros grupos que compararam PCOS com mulheres normais não hirsutas (Gonzalez et al, 2002a).

Com relação à frequência dos alelos do SNP-44 em relação às características clínicas dos grupos PCOS e HI, encontramos que no grupo HI, o alelo C era mais frequente que o T entre as pacientes com medida da cintura e IMC mais elevados. Além disso, este alelo também foi estatisticamente mais frequente nas pacientes HI com sobrepeso ou obesas. Estes achados não eram esperados, uma vez que nossa hipótese, com base nos dados da literatura, era que houvesse uma maior frequência do alelo polimórfico entre as

pacientes com PCOS e não entre as HI. Por outro lado, como descrito em Material e Métodos, o SNP-44 foi o único entre os estudados que não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesta situação, será importante confirmar estes resultados a partir de nova avaliação, utilizando seqüenciamento direto.

Neste estudo, não observamos associação significativa entre a frequência dos alelos do SNP-43 e as características clínicas avaliadas entre os grupos de pacientes com PCOS e HI.

Evans et al, 2001 estudando pacientes ingleses com diabete, evidenciaram uma forte relação entre o SNP-43 e resistência insulínica. Em nosso estudo, o grupo PCOS apresentou uma maior frequência de resistência insulínica, avaliada pelo índice HOMA ($\geq 3,8$), quando comparado com o grupo HI. No entanto, não observamos diferenças significativas com relação à frequência do alelo G do SNP-43 e a resistência insulínica em nenhum dos grupos estudados.

Por outro lado, nossos dados estão de acordo com os de Haddad et al 2002, que compararam PCOS e controles normais e não encontraram resultados positivos quanto à variáveis relacionadas com obesidade ou resistência insulínica. Os resultados descritos aqui também confirmam os de Escobar-Morreale et al, 2002 que incluíram no seu estudo um grupo com HI além de pacientes com PCOS e normais, não tendo observado maior suscetibilidade a risco metabólico em pacientes com PCOS e alelo C. Estes autores, no entanto observaram que a presença de alelo polimórfico em

homozigose estava associado à hirsutismo, independente do diagnóstico, variável esta que não foi avaliada no presente trabalho.

Ao avaliarmos a frequência dos alelos do SNP-19 em relação às características clínicas dos dois grupos, observamos no grupo PCOS uma maior frequência no alelo polimórfico Ins entre as pacientes com sobrepeso/obesidade e que teve uma significância limítrofe. Este dado é interessante pois remete à questão da maior prevalência de obesidade entre pacientes com PCOS. Embora seja bem conhecida a associação entre resistência insulínica e obesidade, vários mecanismos moleculares poderiam estar envolvidos nessa associação.

Hoffstedt et al, 2002 estudaram a relação entre a presença dos polimorfismos do gene da CAPN-10 e a lipólise estimulada pelos receptores β_3 -adrenérgicos em cultura de células de tecido adiposo subcutâneo abdominal humano. Estes autores encontraram uma forte associação entre o genótipo Del do SNP-19 e a redução da função lipolítica. Os indivíduos homozigóticos para o genótipo Del/Del do SNP-19 apresentaram uma redução de 30 vezes na sensibilidade destes receptores em comparação com os indivíduos com genótipos Del/Ins e Ins/Ins. É possível que a atividade destes receptores estimule a termogênese através da ação lipolítica no tecido adiposo pelo aumento da produção de ácidos graxos. Entretanto, é preciso também considerar que os receptores β_3 -adrenérgicos tem um efeito lipolítico menor sobre o tecido adiposo subcutâneo do que os subtipos β_1 e β_2 . A causa da obesidade nas pacientes com PCOS permanece obscura. Uma hipótese seria

o efeito lipogênico provocado pela hiperinsulinemia. Outra possibilidade é que a falta de progesterona predisponha ao aparecimento da obesidade abdominal e a uma mudança no tipo de fibra muscular, ambos contribuindo para o aparecimento de alterações metabólicas e aumentando o risco para doenças cardiovasculares (Ehrmann et al,1995).

Finalmente, o estudo dos alelos do SNP-63 não permitiram demonstrar qualquer associação com as variáveis clínicas e metabólicas estudadas, tanto entre as PCOS quanto entre as HI. As variantes polimórficas deste SNP também foram estudadas por outros autores em relação à pacientes com PCOS e os dados atuais reforçam a idéia de uma ausência de associação isolada com o SNP-63 (Haddad et al, 2002; Ehrmann et al, 2002).

O tamanho da amostra aqui estudada foi similar a de alguns outros estudos avaliando indivíduos com PCOS. Contudo, considerando que a hipótese inicial do trabalho, com base nos dados da literatura, estava relacionada a uma associação entre polimorfismos da CAPN-10 e resistência insulínica e tendo em vista que a maior parte dos resultados foi negativa, pareceu-nos adequado analisar o conjunto das pacientes hirsutas em relação especificamente ao HOMA. Entretanto, não foi possível evidenciar uma associação entre a frequência alélica isolada dos SNP 44, 43, 19 e 63 com relação à variável HOMA. A ausência desta associação pode ser, em parte explicada pela pouca acurácia das variáveis utilizadas para caracterizar presença de resistência insulínica, em especial o índice HOMA. Embora esta variável apresente boa associação com os resultados obtidos com o clamp

euglicêmico hiperinsulinêmico, pontos de corte que definam resistência insulínica em diferentes populações não estão ainda estabelecidos e limites arbitrários, como o utilizado neste estudo, tem sido adotados (Katz et al, 2000; Mahter et al, 2001; Spritzer et al, 2005).

Além disso, cabe notar que não esgotamos, no presente trabalho, a análise da associação dos polimorfismos da CAPN-10 com outras variáveis clínicas, metabólicas e hormonais. Estas análises estão sendo realizadas pelo grupo de pesquisa.

Finalmente, embora não tenha sido o caso aqui, diferentes resultados podem ser obtidos quando populações distintas são estudadas e esta é uma constante preocupação nos estudos de associação genética (Altshuler, 2000; Cardon & Bell, 2001). Estudos com pouco poder estatístico podem, em parte, explicar eventuais dificuldades na reprodução de resultados (Song). As diferenças étnicas/geográficas nas freqüências destas variantes da CAPN-10 podem também ser pronunciadas entre múltiplas populações.

Assim, nosso estudo contribui para aprofundar o conhecimento sobre o envolvimento dos polimorfismos do gene da CAPN-10 com relação à obesidade e resistência insulínica em pacientes com PCOS, oriundas de uma população do sul do Brasil. No contexto do enfoque utilizado na presente pesquisa, que foi a análise isolada de variáveis antropométricas e metabólicas, nossos resultados sugerem a ausência de associação entre os polimorfismos do gene da CAPN-10 e PCOS. Outros estudos serão necessários, avaliando

os demais aspectos fenotípicos nestas pacientes bem como a análise de combinação de haplótipos dos SNPs aqui estudados.

6 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que entre as pacientes PCOS e HI não houve diferença entre a frequências genotípicas e alélicas dos SNPs 44, 43, 19 e 63.
- A comparação das características clínicas dos dois grupos em relação aos alelos de cada polimorfismo estudado mostrou que, nas condições experimentais utilizadas para o SNP-44, o alelo C foi mais frequente entre as pacientes com sobrepeso e obesas do grupo HI.
- Quanto ao SNP-19 da CAPN-10, a comparação das características clínicas dos dois grupos evidenciou que o alelo Ins pode ser mais frequente (significância limítrofe) entre pacientes PCOS estratificadas para sobrepeso ou obesas.
- Não houve diferença na comparação das características clínicas avaliadas e a frequência alélica para os SNPs 43 e 63.

- A análise da amostra total de pacientes hiperandrogênicas, ou seja, pacientes com PCOS e HI agrupadas não evidenciou diferença entre a frequência alélica das variantes genéticas estudadas para a CAPN-10 e a presença de resistência insulínica, avaliada pelo índice HOMA, considerando o valor de 3,8 como ponto de corte.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinmokun A, Harris P, Home PD, Alberti KG. Is diabetes always diabetes? *Diabetes Res Clin Pract* 1992 Nov;18 (2):131-6.
- Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR, Van Etten WJ, Baldwin J, Linton L, Lander ES. Am SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature* 2000; 407 (6803): 513-6.
- American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Treatment of Hyperandrogenic Disorders. *ENDOCRINE PRACTICE* 2001; Vol.7 No.2 March/April.
- Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. *Endocr Rev* 2000; 21:347-62.
- Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106 (7): 69–73.
- Bajaj M, Warefield MD, Schlessinger J, Taylor WR and Bludel T. On the tertiary structure of the extracellular domains of epidermal growth factor and insulin receptors *Biochem Biophys. Res. Comm.* 1987; 916: 220-226.
- Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62 (5):904-10.
- Belfiore A, Costantino A, Frasca F, Pandini G, Mineo R, Vigneri P, Maddux B, Goldfine ID, Vigneri R. Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 in MDA-MB231 breast cancer cells is associated with inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity. *Mol Endocrinol* 1996; 10 (11):1318-26.

- Berson SA & Yalow RS. Plasma insulin concentrations in non diabetic and early iabetic subjects: determinations by a new sensitive immunoassay technique. *Diabetes* 1960; 9: 254-260.
- Bokoch GM and Der CJ. Emerging concepts in Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB* 1993; 7: 750-759.
- Book C-B & Dunaif. A Selective Insulin Resistance In The Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (9):3110-3116.
- Buckley MF, Loveland KA, McKinstry WJ, Garson OM, Goding JW. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1 cDNA cloning of the human molecule amino acid sequence, and chromosomal location. *J Biol Chem* 1990; 265 (29):17506-11.
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Grazziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64:281-302.
- Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D and Dohm GL. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 1987; 79(5):1330-1337.
- Carpenter LC, Duckworth BC, Auger KR, Cohen B, Schaffhausen BS and Cantley LC. Purification and characterization os phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem*1990; 265:10704-10711.
- Chakravarti A to a future of genetic medicine. *Nature* 2001; 409: 822-823.
- Chakravarti, A. Population genetics-making sense out of sequence. *Nature Genet* 1999; 21 (suppl.), 56-60.
- Cheatham B & Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev.* 1995; 16:117-142.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J and Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulatory of pp70 S6kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14(7): 4902-4911, 1994.
- Chin JE, Liu F, Roth RA. Activation of protein kinase C alpha inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol*1994; 8:51-58.
- Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SS. Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 (5):1421-5.

- Ciaraldi TP. Molecular defects of insulin action in the polycystic ovary syndrome: possible tissue specificity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000 ;13 (Suppl 5):1291-3.
- Colilla S, Cox NJ, Ehrmann DA. Heritability of insulin secretion and insulin action in women with polycystic ovary syndrome and their first degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2027–2031.
- Collins A, Lonjou C, Morton NE. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. *PNAS* 1999; 96 (26):15173-15177.
- Collins FS, Guyer MS & Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*. 1997; 278: 1580-1581.
- Comim FV, Spritzer PM. Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:108–113.
- Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ, Jacobs HS. Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; 37:119-125.
- Cox NJ & Bell GI. Disease associations. Chance, artifact, or susceptibility genes? *Diabetes* 1989; 38(8): 947-950.
- Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI, Kong A. A Locus on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nat Genet* 1999; 21(2): 213-215.
- Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, et al. Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertil Steril* 1992; 57:505-513.
- Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T. Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56:147–152.
- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38:1165–1174.
- Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995; 96 (2):801-10.

- Dunaif A. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98 (1A):33S-39S.
- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997; 18 (6):774-800.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999; 22:141-146.
- Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1669-1673.
- Ehrmann DA. Glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome: role of the pancreatic beta-cell. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13 (Suppl 5):1299-1301.
- Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223-1236.
- Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL. Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 2002; 77:581-587.
- Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M, Levy JC, O'Rahilly S, Rao PV, Bennett AJ, Jones EC, Menzel S, prestwich P, simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Ellard S, McCarthy MI, Hattersley AT. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 2001; 69:544-552.
- Ferrannini E, Vichi S, Beck Nielsen H, Laakso M, Paolisso G and Smith U. Insulin action and age. European group for the study of insulin resistance (EGIR). *Diabetes* 1996; 45 (7): 947-953.
- Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrin Metab* 1961 ;21:1140-1148.
- Frajndlich R, Spritzer PM. Association between ovarian volume and serum insulin levels in ovulatory patients with idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 2005; 83(5):1561-1564.
- Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333 (13):853-61.
- Frittitta L, Ercolino T, Bozzali M, Argiolas A, Graci S, Santagati MG, Spampinato D, Di Paola R, Cisternino C, Tassi V and others. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'- untranslated region of

human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes* 2001;50 (8):1952-5.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotypes blocks in the human genome. *Science* 2002; 296 (5576): 2225-2229.

Garant MJ, Kao WH, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, Boerwinkle E, Shuldiner AR. SNP43 of *CAPN10* and the risk of type 2 diabetes in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes* 2002; 51:231–237.

Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev* 1998; 161:11-26.

Goldfine ID. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signalling. *Endocr Rev* 1987; 8:235-255.

Goldstein BJ Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2474-80., 2002.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003; 83(3):731-801.

Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A. *CAPN10* alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002a; 87:3971–3976.

Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Ruiz A, Favez O, Galán JJ, Herreros JÁ, Real LM, Ruiz A 2002 Specific *CAPN10* Gene Haplotypes Influence the Clinical Profile of Polycystic Ovary Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002b; 88(11):5529–5536.

Griffiths A, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin, RC. *Genoma Humano*. In: *Genética Moderna*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

Guo H, Damuni Z. Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2500-2504.

Haddad L, Evans JC, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, Frayling TM, Wilkin TJ, Demaine A, Millward A, Hattersley AT, Conway G, Cox NJ, Bell GI, Franks S, McCarthy MI. Variation within the type 2

diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2606–2610.

Haddad L, Gharani N, Evans J, Cela E, Franks S, McCarthy M. Linkage and association of variants of the diabetes susceptibility-gene NIDDM1 CAPN10 with polycystic ovarian syndrome in European parent-offspring trios. Program of the 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, Ontario, Canada, 2000, p 75 (Abstract 273).

Hall A. ras and GAP – Who’s controlling whom. *Cell.*; 1990 61: 921-923.

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzch H, Schroder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet.*1996; 13(2): 161-6.

Himsworth HP. Diabetes mellitus: a differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Lancet* 1936; 1: 127-130.

Hoffstedt J, Näslund E, Arner P. Calpain-10 Gene Polymorphism Is Associated with Reduced β_3 -Adrenoceptor Function in Human Fat Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7): 3362–3367.

Hoffstedt J, Rydén M, Lofgren P, Orho-Melander M, Groop L, Arner P. Polymorphism in the calpain 10 gene influences glucose metabolism in human fat cells. *Diabetologia* 2002; 45:276-82.

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2000; Oct. 26 (2):163-75. Erratum in: *Nat Genet* 2000 Dec; 26 (4):502.

Jahanfar S, Eden JA, Nguyen T, Wang XL, Wilcken DE. A twin study of polycystic ovary syndrome and lipids. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11(2):111-7.

Judson R, Stephens JC, Windemuth A. The predictive power of haplotypes in clinical response. *Pharmacogenomics* 2000; 1(1): 15-26.

Kahn CR, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest.* 1988; 82:1551-1555.

- Kahn CR. Insulin action diabetogenes, and the cause of Type II diabetes. *Diabetes* 1994; 43:1066–1084.
- Kahn CR. Insulin receptors and insulin signaling in normal and disease states. In: *International Textbook of Diabetes* (eds. Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA and Keen H), 1997; 2nd Ed, pp 437-467. John Wiley & Sons, Limited, Chichester.
- Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 1985; 36:429-51.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402–2410.
- Khoury MJ, Beaty TH. Application of the case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol Rev* 1994; 16(1): 134-150.
- Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 2000; 105 (2):199-205.
- Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 (9):3078-82.
- Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274: 536-539.
- Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (1):165-9.
- Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* 1998; 53:217-56.
- LeRoith D, Adamo M, Werner H, Roberts C. Molecular and Cellular Biology of the Insulin-like Growth Factors. In: *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical correlations* (Ed. Bruce D. Weintraub), Raven Press Ltd., New York. 1995; p. 181-193.
- Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M. Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* 2002; 51:247–250.
- Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A, Spencer S, Grupe A, Henzel W, Stewart TA and others. Membrane

glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin- dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995; 373 (6513):448-51.

Mather, K.J., Hunt, A.E., Steinberg, H.O., Paradisi G., Hook G., Katz A, Quon M.J., Baron A D. Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86(11), 5457-5464.

Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215.

Moller DE, Flier JS. Detection of an alteration in the insulin-receptor gene in a patient with insulin resistance, *Acanthosis nigricans*, and the polycystic ovary syndrome (type A insulin resistance). *N Engl J Med* 1988; 319 (23):1526-9.

Monteiro JB. Determinants genéticos de la resistencia a l'insulina et du diabete sucre. Exploracion par SNP (single nucleotide polymorphism) de la calpaine-10 et d 'autres zones candidates dans la population Amazonienne du Brésil, 2004. 136 fls Tese (Doutorado em Medicina) – Université de Montpellier, França e Universidade Federal da Amazônia, Manaus, Brasil.

Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS, et al. Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in non-obese and obese women with polycystic ovary syndrome: Common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2854-64.

Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ;83 (6):2001-5.

Nestler JE, Jakubowicz DJ. Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decreases in ovarian P450c17 alpha activity and serum androgens. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82:4075-4079.

Nishida E & Gotoh Y. The Map kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS* 1993;18: 128-131.

Norman RJ, Masters S, Hague W. Hyperinsulinemia is common in family members of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1996; 66 (6): 942-7.

Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM 2003 Gene expression of type 2 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids* 2003; 68:641–649.

- O'Meara NM, Blackman JD, Ehrmann DA, Barnes RB, Jaspan JB, Rosenfield RL, Polonsky KS. Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76 (5):1241-7.
- Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lindgren CM, Groop L 2002 Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes* 2002; 51:2658–2664 .
- Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 2002; 77(6): 1095-1105.
- Pericak-Vance MA Linkage disequilibrium and allelic association. In : Approaches to gene mapping in complex human diseases. (eds) Wiley-Liss 1998; Chap 15: 323-334.
- Permutt MA, Bernal-Mizrachi E, Inoue H . Calpain 10: the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes? *J Clin Invest* 2000; 106:819–821.
- Pillay TS, Whittaker J, Lammers P, Ullrich A, Siddle K. Multisite serine phosphorylation of the insulin and IGF-1 receptors in transfected cells. *FEBS Lett* 1991; 288:206-211.
- Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R and others. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48 (9):1881-4.
- Rapuano M, Rosen OM. Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J Biol Chem* 1991; 266:12902-12907.
- Rasmussen SK, Urhammer SA, Berglund L, Jensen JN, Hansen L, Echwald SM, Borch-Johnsen K, Horikawa Y, Mashima H, Lithell H, Cox NJ, Hansen T, Bell GI, Pedersen O. Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians. *Diabetes* 2002; 51:3561–3567.
- Rasmussen SK, Urhammer SA, Pizzuti A, Echwald SM, Ekstrom CT, Hansen L, Hansen T, Borch-Johnsen K, Frittitta L, Trischitta V and others. The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* 2000; 49 (9):1608-11.
- Raynard E, Brun JF, Pérez-Martin A, Fédou C and Mercier J. Evaluation in vivo de la sensibilité à l'insuline et applications cliniques. *Ann Biol Clin* 1998; 56: 407-416.

- Risch N & Merikangas K. The future of genetics studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-1517.
- Roth RA, Beaudoin J. Phosphorylation of purified insulin receptor by cAMP kinase. *Diabetes* 1987; 36:123-126.
- Roth RA, Cassell DJ. Insulin receptor: evidence that it is a protein kinase. *Science* 1983; 219:299-301.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001; Feb 15; 409 (6822):928-33.
- Scheen AJ, Paquot N, Lethiexhe MR, Castillo MJ and Lefebvre PJ. Comment explorer la sensibilité à l'insuline chez l'homme? *Ann. Endocrinol* 1995; 56: 523-529.
- Serafini P, Lobo RA. Increased 5 α -reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 1985; 43:74-78.
- Sharchan, T. Projeto Genoma Humano. In: *Genética Molecular humana*, Ed. Artmed, 2002.
- Sorbara LR, Tang Z, Cama A, Xia J, Schenker E, Kohanski RA, Poretsky L, Koller E, Taylor SI, Dunaif A. Absence of insulin receptor gene mutations in three insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1994; 43 (12):1568-74.
- Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Birman P, Mowszowicz I, Raux-Demay MC, Clair F, Kuttenn F, Mauvais-Jarvis P. Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70 (3):642-6.
- Spritzer PM LK, Poy M. Hiperandrogenismo. Freitas F MC, Rivoire W, editor: Ed. Artes Médicas Sul Ltda;1997; 305-317 p.
- Spritzer PM MM, Farias A, Bittencourt Jr PIH. Nitric oxide levels and hyperinsulinemia in postmenopausal women : relationship with hormonal, metabolic and anthropometric measurements. Genazzani AR PF ; 2001; editor.
- Spritzer PM, Comim FV, Capp E, D'Avila AM. Influence of leptin, androgens and insulin sensitivity on the increased GH response to clonidine in

lean patients with polycystic ovary syndrome. *Hormone and Metabolic Research*. 2005; 37(2):94–98.

Spritzer PM, Oppermann-Lisboa K, Mattiello S, Lhulier F. Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin Endocrinol* 2000; 52:587-94.

Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E. Leptin levels in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Human Reprod* 2001;16:1340-46.

Spritzer PM, Ribeiro MF, Oliveira MC, Barbosa-Coutinho LM, Silva IS, Dahlem N, Cericatto R, Pavanato MA. Effects of tamoxifen on serum prolactin levels, pituitary immunoreactive prolactin cells and uterine growth in estradiol-treated ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 1996; 28 (4):171-6.

Spritzer PM. Revisitando o hirsutismo. *Arq Bras Endocrinol e Metab* 2000; 46: 127-136.

Sreenan SK, Zhou Y-P, Otani K, Hansen PA, Currie KPM, Pan C-Y, Lee J-P, Ostrega DM, Pugh W, Horikawa Y, Cox NJ, Hanis CL, Burant CF, Fox AP, Bell GI, Polonsky KS. Calpains Play a Role in Insulin Secretion and Action. *Diabetes* 2001; 50: 2013- 2020.

Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past... *Nature* 2001; 409: 821-822.

Strauss JF, 3rd, Dunaif A. Molecular mysteries of polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 1999; 13(6):800-5.

Stumvoll M, Fritsche A, Madaus A, Stefan N, Weisser M, Machicao F, Haring H. Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism in the CAPN10 gene for proinsulin processing and insulin secretion in nondiabetic Germans. *Diabetes* 2001; 50:2161–2163.

Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(5):1979-83.

Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon J, Sierra MDLL, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E and others. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocr Rev* 1992; 13:566-595.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81 (1): 19-25.

- Thompson MW, McInnes RR & Willard HF. Variação genética, polimorfismo e mutação. In: Genética Médica, Guanabara Koogan, 5ª. ed, Rio de Janeiro, 1993.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao Y-C, Tsubokawa M and others. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313:756-761.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203-212.
- van Driel IR, Goding JW. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. Primary structure deduced from cDNA clones. *J Biol Chem* 1987; 262(10):4882-7.
- Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 1990; 113 (12):909-15.
- White MF, Maron R and Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature (Lond)* 1985; 318: 183-186.
- White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: S2-S17.
- WHO Consultation on Obesity. Preventing and managing the global epidemic Geneva: world Health Organization p 1-276, 1997.
- WHO Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of a WHO consultation.(www.who.int/) WHO/NCD/NCS/99.2, 1999.
- Wild RA. Obesity, lipids, cardiovascular risk, and androgen excess. *Am J Med.* 1995; 98 (1A):27S-32S.
- Willis D, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin- like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(12):3788-90.
- Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(1):302-9.
- Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarcho

and the polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;
92 (23):10619-23.