

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Polimorfismos do gene da calpaína 10 (*CAPN10*) e associação com Síndrome Metabólica em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)**

Denusa Wiltgen

Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz F. Kohek

Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Porto Alegre, junho 2005

Wiltgen, Denusa

Polimorfismos do gene da calpaína 10 (*CAPN10*) e associação com Síndrome Metabólica em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) / Denusa Wiltgen. -- Porto Alegre: UFRGS/ Faculdade de Medicina, 2005

v, 70 f.; il.;

Orientador: Poli Mara Spritzer

Dissertação (mestrado) - UFRGS/ Faculdade de Medicina/ PPG Ciências Médicas: Endocrinologia, 2005

Referências bibliográficas: f. 16-19; f. 35-40; f. 59-65

1. Síndrome dos Ovários Policísticos. 2. Polimorfismos da Calpaína 10.  
3. Hirsutismo. 4. Resistência Insulínica. 5. Síndrome Metabólica. - Tese. I  
Spritzer, Poli Mara. II Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, PPG Ciências Médicas: Endocrinologia. III Título

## Pensamento e Agradecimento

*" No momento em que realmente nos decidimos, então o universo começa a agir também. Todo o tipo de coisa começa a ocorrer - coisas que não ocorreriam normalmente, mas que acontecem porque você toma a decisão. Uma série de eventos flui desta decisão, levantando a nosso favor todos tipos de imprevistos, encontros e assistência material que nenhuma pessoa no mundo poderia planejar que ocorresse na sua vida. Seja lá o que você possa fazer, ou tenha sonho de fazer - comece. O arrojo tem dentro de si inteligência, poder e mágica. Então, comece agora.."*

Goethe

Agradeço a todos que me ajudaram a ter coragem de começar e, certamente, continuar... Sinto-me agraciada pelo "universo" por ter contado com vocês em todos os momentos, pois tenho convicção que, mesmo em pequenos atos, muitos dos quais considerados corriqueiros ou insignificantes, minha caminhada foi (e continua sendo) menos árdua porque vocês existem. Palavras como amor, amizade, companheirismo, compaixão, disponibilidade, responsabilidade, admiração, ... não resumem o que foi-me oferecido sem pedido de recompensa. Espero que eu tenha sorrido o suficiente, e dito "muito obrigado" suficiente, ou parabéns o suficiente.. Se não, me perdoem, e aceitem este trabalho como uma pequena forma de agradecimento pelo incomensurável valor de suas existências na minha vida. Obrigada, de coração!

Denusa

# ÍNDICE

## I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Introdução	6
Fisiopatogenia da PCOS - influência da resistência insulínica	8
Calpaína e associação com DM2	10
Calpaína e Síndrome dos Ovários Policísticos	14
Objetivos	16
Referências	17

## II. ARTIGO EM INGLÊS

Title	20
Abstract	21
Introduction	22
Patients and Methods	23
Results	27
Discussion	29
References	33
Tables	39

## III. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Título	46
Resumo	47
Introdução	48
Pacientes e Métodos	49
Resultados	52
Discussão	54
Referências	58
Tabelas	65

# **I. REVISÃO DA LITERATURA**

## Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é a uma doença de apresentação heterogênea cujas principais características clínicas são anovulação crônica e manifestações de hiperandrogenismo. Estima-se que 5-10% (1,2,3) das mulheres em idade reprodutiva apresentam esta síndrome, o que a torna de grande relevância clínica pois sua prevalência é semelhante a de doenças de grande impacto na medicina como, por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Além dos distúrbios reprodutivos, as pacientes com PCOS apresentam, frequentemente, alterações metabólicas que incluem resistência insulínica, obesidade e dislipidemia. Estudos recentes demonstram que 25 a 35% das mulheres obesas com PCOS são diagnosticadas como intolerantes a glicose ou diabéticas ao redor dos 30 anos de idade (4) e, no geral, pacientes com esta síndrome apresentam 3 a 7 vezes mais risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em comparação com a população geral (5). Esta constelação de fatores torna este grupo de pacientes uma população especial na qual o acompanhamento médico precoce com intervenções ativas e efetivas na modificação de riscos podem diminuir a morbidade metabólica e, conseqüentemente, o risco potencial de doença cardiovascular.

Para estabelecer o diagnóstico de PCOS é necessário excluir outras patologias com apresentação clínica similar como hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing, distúrbios tireoidianos e tumores produtores de androgênios (6,7,8) Recentemente um consenso internacional propôs que esta síndrome é diagnosticada quando, após a exclusão das situações acima, pelo menos dois dos seguintes critérios estão presentes (9):

- oligovulação ou anovulação, usualmente manifestando-se como oligomenorréia ou amenorréia;
  
- níveis elevados de androgênios circulantes ou manifestações clínicas de excesso de androgênios (hirsutismo, acne, alopecia);

- comprovação ultrassonográfica de ovários policísticos (presença de 12 ou mais folículos em cada ovário com diâmetro entre 2-9 mm, e / ou aumento do volume ovariano - > 10ml - ).

Por estar associada com anormalidades reprodutivas e por ser o ponto central das alterações metabólicas encontradas nestas pacientes, vários pesquisadores têm estudado métodos para detectar a presença de resistência insulínica (resposta hiperinsulinêmica para manter estado euglicêmico) nas mulheres com PCOS. Dunaif e col propuseram uma razão simples entre glicemia de jejum/insulina basal (G/I) para diagnóstico de resistência insulínica em mulheres adolescentes e adultas com esta síndrome. Contudo seus resultados não permitem extrapolação para outras populações: índices G/I menores que 4.5 poderiam ser utilizados para rastreamento de resistência insulínica apenas em adultas obesas e, nas adolescentes, esta razão apresentou baixa especificidade (10,11). Já o índice HOMA, modelo matemático criado em 1985 que permite estimar a função da célula  $\beta$  e sensibilidade à insulina, apesar de boa correlação com o teste padrão-ouro ("clamp" euglicêmico hiperinsulinêmico), não apresenta consenso quanto ao ponto de corte que permita prevêr melhores valores preditivos no diagnóstico de resistência insulínica (11,12). Portanto, até o momento, nenhum índice calculado de resistência insulínica foi validado para rastreamento nas pacientes PCOS e na população geral, já que estes não são capazes de identificar variações dinâmicas nos níveis de insulina ou predizer com segurança desfechos de relevância clínica (13). Para identificar, então, pacientes em maior risco de desenvolver DM2 e doença cardiovascular, têm-se utilizado os critérios de síndrome metabólica (14,15).

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica\*\* em pacientes com PCOS

Fator de Risco	Ponto de Corte
1. Obesidade abdominal (cintura)	> 88 cm
2. Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
3. HDL-c	< 50 mg/dl
4. Pressão arterial sistêmica	≥ 130/≥85 mmHg
5. Glicemia de jejum	110-126 mg/dL

\*\* Diagnóstico de Síndrome Metabólica ocorre na presença de 3 critérios  
Critérios conforme *National Cholesterol Education Program* (NCEP) (14)

### **Fisiopatogenia da PCOS - influência da resistência insulínica**

A etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos ainda é ponto controverso. Acredita-se que as anormalidades encontradas nesta síndrome sejam multifatoriais e que a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da doença seja determinada pela ação conjunta de fatores ambientais e genéticos.

Classicamente, o estado de anovulação persistente nas pacientes com PCOS é caracterizado por níveis elevados de androgênios e estrogênios de forma não cíclica, estimulados pela liberação de hormônio luteinizante (LH) com pulsatilidade e amplitude aumentadas (16), em decorrência de alterações na pulsatilidade do GnRH (17,18).

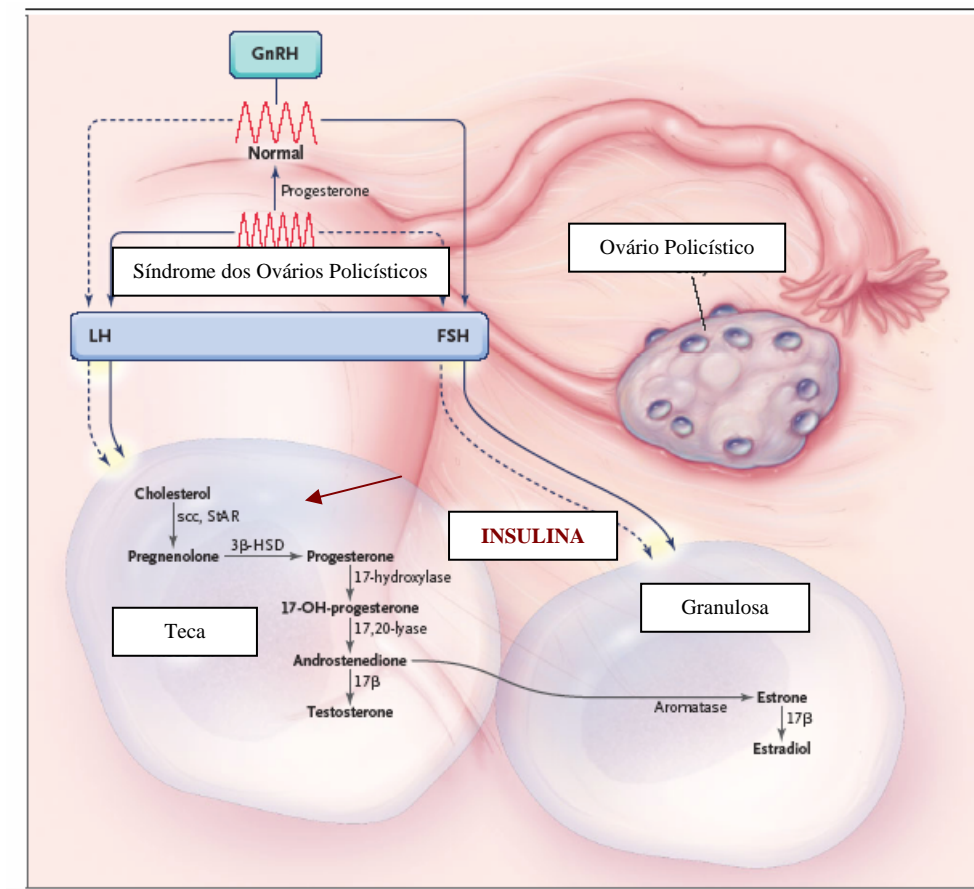
Quando presente, a hiperinsulinemia parece agir direta e indiretamente na patogênese da PCOS. Rosenfield e col. relatam que a insulina estimula diretamente a produção ovariana de androgênios através de ação nas enzimas esteroidogênicas. Estudos *in vitro* demonstram que a insulina pode estimular a produção e liberação de LH, aumentar o número de receptores ovarianos de LH e diminuir a produção de IGFBP-I (*insulin-like growth factor-binding protein I*) agindo indiretamente para o aumento da produção androgênica. A hiperinsulina também diminui a produção



hepática da globulina ligadora de hormônios esteróides (SHBG), permitindo que uma maior quantidade de testosterona permaneça em sua forma livre e biologicamente ativa. Como algumas pacientes com PCOS apresentam resistência insulínica e hiperinsulinemia compensatória, a concentração de testosterona livre é geralmente alta mesmo diante de níveis normais ou moderadamente elevados de testosterona total.

Contudo, o mecanismo pelo qual as pacientes com PCOS tornam-se mais resistentes à insulina, independente da presença da obesidade, ainda não foi elucidado. Postula-se que alterações estruturais nos genes que modulam sua ação, ou do seu receptor, possam estar envolvidas (19). Dentre eles, destaca-se o gene da calpaína.

Figura 1: Eixo hipotálamo-hipófise-ovário e papel da insulina na Síndrome dos Ovários Policísticos



\*\* Seta escura denota um maior grau de estimulação comparada à seta pontilhada.

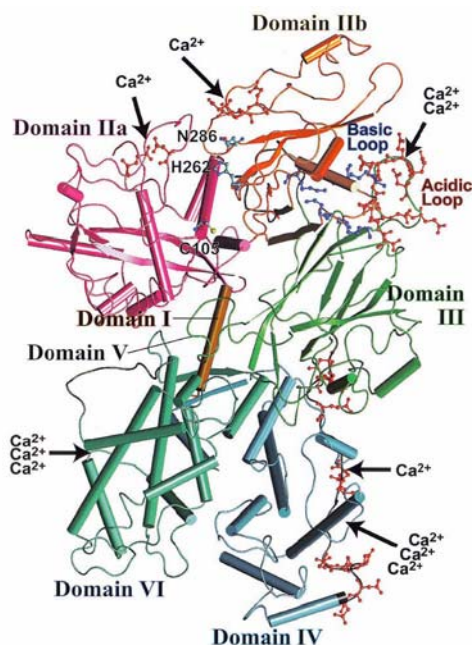
Adaptado de Ehrmann, NEJM, 2005

## Calpaína e sua associação com DM2

A calpaína é uma protease citoplasmática expressa em todas as células que está supostamente implicada em uma variedade de processos regulados pelo cálcio como proliferação, diferenciação e apoptose celular, através da ativação ou inativação de proteínas (20).

Estudos de biologia molecular revelaram que a calpaína constitui uma superfamília composta de 14 membros, muitos deles estando associados com o surgimento de doenças em humanos. As calpaínas consistem de uma grande subunidade catalítica e de uma pequena subunidade regulatória. A subunidade maior contém 4 domínios (I–IV), e o centro catalítico da protease está localizado no domínio II. O domínio I é a porção N-terminal que é processada durante a ativação da enzima, o domínio III é a porção de ligação e o domínio IV é a porção C-terminal na qual ocorre a ligação com o cálcio, com estrutura semelhante a calmodulina (20, 21).

Figura 2: Estrutura tridimensional da calpaína humana

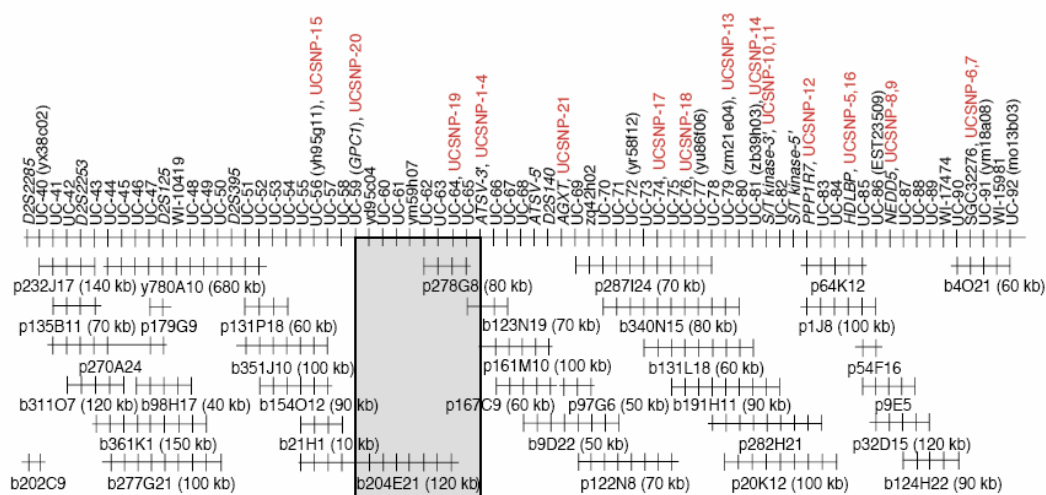


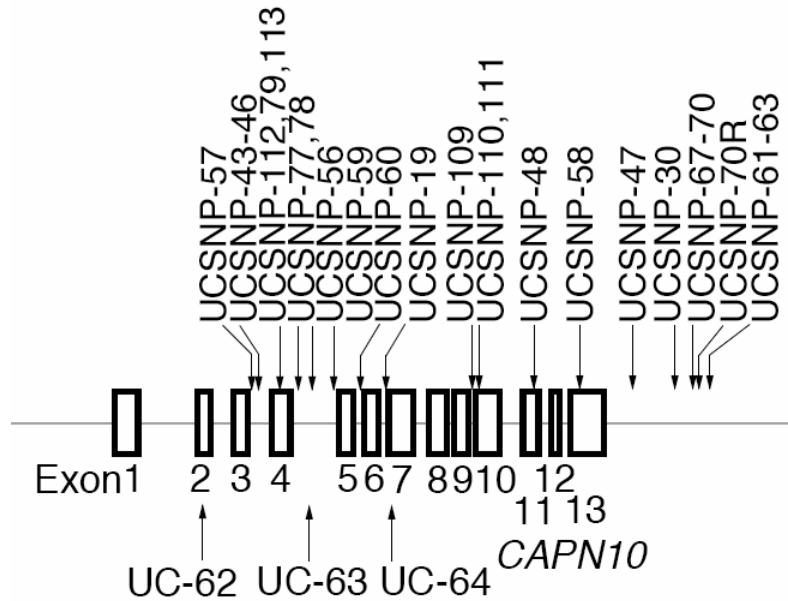
\*Adaptado de Suzuki e col, Diabetes, 2004

A calpaína 10 é uma calpaína atípica porque não possui a porção semelhante a calmodulina no domínio IV. Juntamente com as calpaínas 5 e 6, a *CAPN10* forma uma subfamília de calpaínas que contém porção C-terminal. Acredita-se que a calpaína 10 está implicada na diferenciação dos adipócitos, na produção hepática de glicose, no metabolismo dos ácidos graxos livres e na ação e secreção da insulina (22, 23).

O gene da *CAPN10* está localizado no braço longo do cromossomo 2, dentro da região de susceptibilidade genética para diabetes mellitus denominada NIDDM 1. É composto por 15 éxons que, após traduzidos, produzem proteínas que variam de 672 a 138 aminoácidos. Vinte e três polimorfismos (variações de nucleotídeos do genoma que ocorrem com uma frequência maior que 1%) foram identificados no intervalo correspondente ao gene da calpaína: 22 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e 1 polimorfismo de deleção/inserção (20, 21).

Figura 3. Mapa da região NIDDM 1 e do gene da calpaína 10

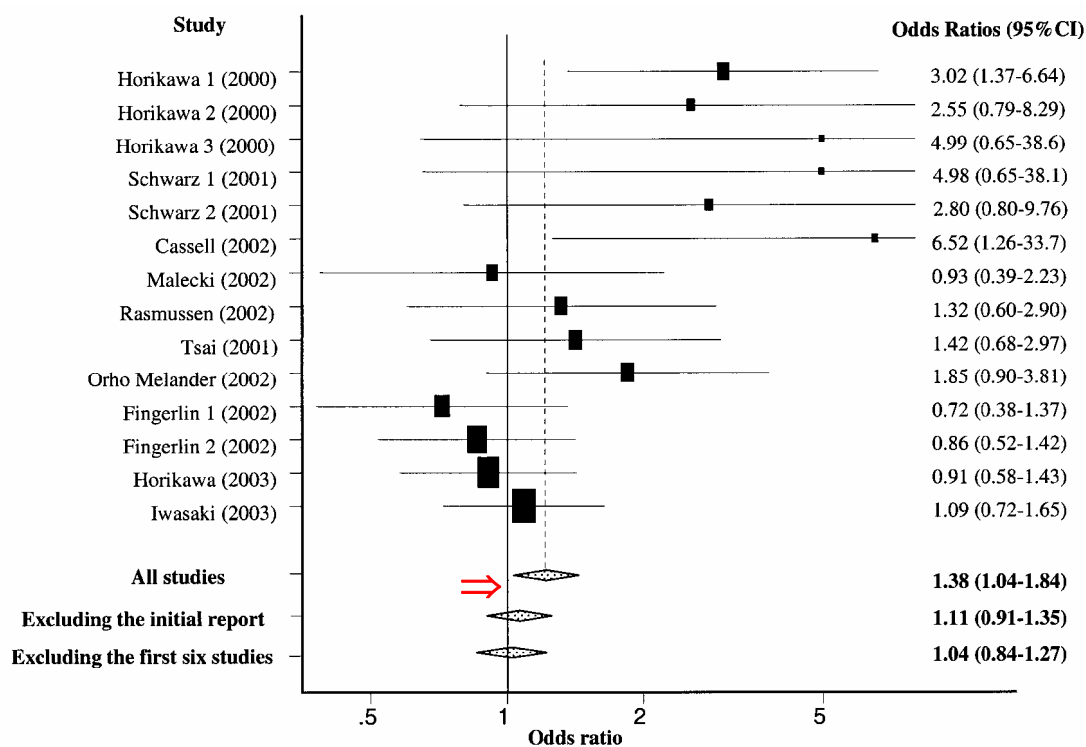




Recentemente, Horikawa e col (21) observaram que polimorfismo de um único nucleotídeo designado UCSNP43 (*CAPN10*-g.4852G/A,) mostrava uma maior prevalência do alelo comum G em pacientes diabéticos. Contudo, o genótipo de risco GG não estava associado com aumento significativo no risco de diabetes (odds ratio 1.54, intervalo de confiança de 95% 0.88-2.41). Assim, definiu-se uma combinação específica de três variantes intrônicas do gene da calpaína incluindo UCSNP43 (íntron 3), UCSNP-19 (*CAPN10*-g.7920indel32bp, íntron 6) e UCSNP-63 (*CAPN10*-g.16378C/T, íntron 13), na qual o par de haplótipos 112/121 (G-2R-T/G-3R-C) acarretou em risco 2.8 vezes maior para o desenvolvimento de DM2 em Americanos-Mexicanos e em duas populações do norte da Europa.

Após este estudo pioneiro, frequências genotípicas e do haplotipo de risco foram avaliadas em outras populações encontrando-se resultados variáveis. Song e col (24) realizaram uma metanálise com estudos publicados até julho de 2003 e demonstraram a grande heterogeneidade de resultados na busca de associação do gene da calpaína com DM2. Os autores discutem que diferenças étnicas, interações genéticas, ambientais e problemas estatísticos certamente influenciam estes resultados e defendem a idéia de que novos estudos de associação de larga escala e bem delineados devem ser executados em conjunto com estudos funcionais da calpaína.

Figura 4: Estudo de metanálise analisando o haplotipo de risco 112/121 em comparação com outras combinações de variantes genéticas do gene *CAPN10* em diferentes populações



\* Adaptado de Song e col, Am J Hum Genet, 2004

Já alguns autores têm reportado associação de polimorfismos da *CAPN10* com desfechos secundários como dislipidemia, hipertensão e obesidade. Em uma amostra da população japonesa, os polimorfismos UCSNP-44 e UCSNP-43 estavam relacionados com dislipidemia, mas não com a presença de DM2 (25), e a variante polimórfica UCSNP-19 estava associada com obesidade e maiores níveis de hemoglobina glicosilada (26).

## Calpaína e Síndrome dos Ovários Policísticos

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

Até o presente momento cinco estudos foram realizados na tentativa de relacionar diferentes polimorfismos do gene *CAPN10* com o diagnóstico e as características clínicas da PCOS.

Gonzalez e col. (27) estudaram a frequência alélica e genotípica das variantes polimórficas UCSNP-44, UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 em 55 mulheres com PCOS e 93 controles, todas provenientes da população espanhola. Os resultados indicaram uma associação entre UCSNP-44 (*CAPN10*-g4841T/C, íntron 3) e o diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos ( $p=0.01$ ). O mesmo grupo em 2003 (28) confirmou esta associação em uma amostra maior de pacientes com PCOS ( $n=148$ ) e evidenciou que as pacientes com haplotipo de risco 1121 apresentavam níveis mais elevados de colesterol total quando comparados a todos outros haplotipos somados. Este achado tornava-se ainda mais evidente nas pacientes com ovário policístico associado com manifestação clínica de hiperandrogenismo (hirsutismo).

Ehrmann e col (29) avaliaram 212 mulheres com PCOS, 124 caucasianas de origem europeia, 57 afro-americanas, 13 hispânicas, 13 asiáticas e 5 provenientes do oriente médio. Foram genotipados 3 polimorfismos da *CAPN10* (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) e analisados nas pacientes caucasianas e afro-americanas para presença de associação com PCOS e características relacionadas a DM2. Não houve diferença de frequência alélica ou haplotípica comparando-se das duas populações. Entretanto as pacientes afro-americanas com a combinação de haplotipos de risco 112/121 apresentaram maiores níveis de insulina em resposta a estímulo com glicose em comparação com os outros haplotipos. Este achado foi ainda mais

interessante pois as pacientes com esta combinação haplotípica apresentavam menor índice de massa corporal que as demais. Além desta associação com níveis de insulina nas pacientes afro-americanas, a combinação de haplotipos 112/121 esteve associado com risco aumentado para PCOS duas vezes maior em todas as pacientes (caucasianas e afro-americanas).

Escobar e col. (30) genotiparam os polimorfismos UCSNP-44, UCSNP-43 e UCSNP-45 do gene da calpaína 10 em 97 mulheres hiperandrogênicas (81 PCOS e 16 pacientes hirsutas idiopáticas - presença de hirsutismo mas com ciclos ovulatórios e androgênicos em níveis normais), comparadas com 37 controles normais. Foi encontrada uma relação da presença do alelo polimórfico em homozigose no locus UCSNP-43 com maior grau do hirsutismo, independente do diagnóstico etiológico. Também demonstrou-se uma maior frequência do alelo polimórfico no UCSNP-45 nas pacientes hirsutas idiopáticas, porém o pequeno número de pacientes analisadas não permite conclusões definitivas sobre este achado.

Por fim, Haddad e col. (31) não encontram associação entre os polimorfismos UCSNP-44, UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 da *CAPN10*, isolados ou formando haplotipos, com susceptibilidade para PCOS em uma amostra de pacientes caucasianas de origem européia.

Assim como nos estudos com DM2 , a variabilidade dos achados em diferentes populações de pacientes com PCOS não permite estabelecer associação entre o gene da *CAPN10* e este diagnóstico até o presente momento. No entanto, poucos estudos avaliaram a relação destes polimorfismos com desenvolvimento de um pior perfil metabólico neste grupo de pacientes jovens e sabidamente de risco para comorbidades metabólicas e cardiovasculares.

**Objetivos:**

1. Verificar a presença de associação de variantes polimórficas do gene da *CAPN10* (UCSNP- 43, UCSNP-19 e UCSNP-63) com o diagnóstico de PCOS em uma população de pacientes hirsutas.
2. Determinar a influência destes polimorfismos da *CAPN10* nas características clínicas e bioquímicas que compõem a síndrome metabólica nestas pacientes.



## Referências

1. **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL** 1995 Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 16:322–353
2. **Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R** 1998 Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3078–3082
3. **Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF** 2000 A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2434–2438
4. **Ehrmann DA** 1997 Obesity and glucose intolerance in androgen excess. In: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D, eds. *Androgen excess disorders in women*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 705–712
5. **Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A** 1999 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* 84:165–169
6. **Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Kuttan F, Mauvais-Jarvis P** 1990 Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 70:642–646
7. **Azziz R, Dewailly D, Owerbach D** 1994 Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 78:810–815
8. **Spritzer PM, Opperman-Lisboa K, Mattiello S, Lhullier F** 2000 Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol* 52:587–594
9. **The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group** 2003 Revised consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 19-25

10. **Legro RS, Finegood D, Dunaif A** 1998 A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2694–2698
11. **Palmert MR, Gordon CM, Kartashov AI, Legro RS, Emans SJ, Dunaif A** 2002 Screening for Abnormal Glucose Tolerance in Adolescents with Polycystic Ovary Syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1017–1023
12. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
13. **American Diabetic Association** 1998 Consensus Development Conference on Insulin Resistance. *Diabetes Care* 21:310–314
14. **Executive Summary of Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)** 2001 *JAMA* 285:2486–2497
15. **Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ** 2005 The Metabolic Syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428
16. **Ehrmann DA** 2005 Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 352:1223-1236
17. **Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF Jr.** 1988 Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab*;66:165-72.
18. **Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL.** 2000 Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 4047-52.
19. **Legro RS, Strauss JF** 2002 Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 78: 569-576
20. **Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H** 2004 Structure, Activation, and Biology of Calpain. *Diabetes* 53: S12-S18

21. **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** 2000 Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26:163–175
22. **Patel YM, Lane DM** 1999 Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Nat Acad Sci* 96: 1279 - 11285
23. **Smith LK, Rice KM, Garner, CW** 1996 The insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease. *Mol Cell Endocrinol* 122: 81-92
24. **Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S** 2004 Are Variants in the *CAPN10* Gene Related to Risk of Type 2 Diabetes? A Quantitative Assessment of Population and Family-Based Association Studies. *Am J Hum Genet* 74:208–222
25. **Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T** 2002 Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147-152
26. **Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H** 2002 Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147-152
27. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A** 2002 *CAPN10* alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3971-3976
28. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Ruiz RL, Fayez O, Galan JJ, Herreros JÁ, Real LM, Ruiz A** 2003 Specific *CAPN10* Haplotypes Influence the Clinical Profile of Polycystic Ovary Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5529- 5536
29. **Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ** 2002 Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1669-1673

30. **Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL** 2002 Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 77:581–587
31. **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** 2002 Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Meta* 87:2606–2610

## II. ARTIGO EM INGLÊS

**Association between *CAPN10* UCSNP-43 and UCSNP-19  
polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary  
syndrome (PCOS)**

Calpain-10 gene polymorphisms in PCOS

<sup>1,2</sup>Denusa Wiltgen, <sup>2</sup>Lúcia Furtado, <sup>2,3</sup>Maria Beatriz F Kohek, <sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology and Neuroendocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul), and PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa).

## ABSTRACT

Context: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a heterogeneous endocrine disorder with individual susceptibility determined by genetic and environmental risk factors. PCOS individuals present a higher prevalence of insulin resistance, hypertension and type 2 diabetes (T2DM). Association studies revealed that calpain 10 (*CAPN10*) gene is related to genetic predisposition to T2DM in different populations. Recently, studies have evaluated the *CAPN10* gene in PCOS patients suggesting that different alleles may play a role in PCOS susceptibility. Objective: To assess whether polymorphisms in the *CAPN10* gene (UCSNP- 43, UCSNP-19, UCSNP-63) are related with PCOS etiology in a population of hirsute patients from southern Brazil and to evaluate the influence of these genetic variants on clinical and biochemical features of metabolic syndrome. Design: Cross-sectional study comparing hirsute patients with PCOS or idiopathic hirsutism (IH: ovulatory cycles, normal androgen levels and isolated hirsutism). Results: The frequency of polymorphic alleles in UCSNP-43, UCSNP-19, and UCSNP-63 were similar in PCOS and IH. In contrast, in PCOS polymorphic variants in UCSNP-43 and UCSNP-19 were related to higher LDL-c level ( $P < 0.01$ ) and to metabolic syndrome (UCSNP-43,  $P = 0.049$ ; UCSNP-19,  $P = 0.07$ ). This was not true in IH women. Variables related to insulin resistance or to hyperandrogenism were associated with the PCOS etiology itself, independently of the genetic variants of *CAPN10*. There was no association between UCSNP-63 and phenotypic traits in PCOS. Conclusion: These results provide evidence that *CAPN10* gene UCSNP-43 and UCSNP-19 polymorphisms may influence the PCOS metabolic phenotype.

**Keywords:** insulin resistance, androgens, hirsutism, metabolic syndrome, PCOS, gene polymorphisms, CAPN-10,

## Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex and prevalent endocrine disease characterized by ovulatory dysfunction and hyperandrogenism. In addition, PCOS patients present metabolic disturbances, such as dyslipidemia, insulin resistance and impaired glucose tolerance, which increase the risk of developing type 2 diabetes (T2DM) and possibly enhance the risk of cardiovascular disease (1-5). However, the mechanisms involved in the etiology of PCOS and the association of PCOS with insulin resistance are still unclear. The current evidence indicates that PCOS is a multifactorial disease and that individual susceptibility is probably determined by multiple genetic and environmental risk factors.

Calpains are a family of nonlysosomal cysteine proteases found in all tissues. Experimental studies suggest that these enzymes could be implicated in adipocyte differentiation, modulation of insulin secretion and action and free fatty acid metabolism (6,7), all of which are relevant for PCOS. The calpain-10 gene (*CAPN10*), which consists of 15 exons spanning 31 kb, located on chromosome 2q37.3, was the first candidate gene for T2DM. Horikawa et al. (8) found that three polymorphisms in the *CAPN10* gene (UCSNP-43, UCSNP-19, and UCSNP-63) defined a high-risk haplotype in Mexican Americans and northern Europeans, implying a 3-fold increase in the risk for T2DM. Since the Horikawa study, several investigators have studied the association between the population frequency of polymorphic variants of *CAPN10* and T2DM prevalence (9-16). Recently, some studies have also evaluated the *CAPN10* gene in PCOS patients. Although no clear association was observed with most of the clinical, hormonal and metabolic characteristics of this special group, the molecular genetic analysis suggests that *CAPN10* alleles may play a role in PCOS susceptibility (17-21). It is important to

note, however, that these studies have focused on the haplotype/genotype distribution of the *CAPN10* UCSNP-43, UCSNP-19, and UCSNP-63 polymorphisms, without inquiring on the possible influence of each single polymorphic variant on the development of PCOS or its clinical characteristics.

Therefore, the aims of the present study were: 1) to assess whether polymorphisms in the *CAPN10* gene (UCSNP- 43, UCSNP-19 and UCSNP-63) are related with PCOS etiology in a population of hirsute patients from southern Brazil; and 2) to evaluate the influence of these genetic variants of the *CAPN10* gene on the clinical and biochemical features of metabolic syndrome in these patients.

## **Patients and Methods**

### ***Patients***

The population consisted of 92 hirsute women recruited from the Gynecological Endocrinology Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. None had received any drugs known to interfere with hormonal levels for at least 3 months before the study. PCOS patients (n=61) were defined by oligo/amenorrheic cycles (<9 cycles/year), increased levels of serum testosterone and/or free androgen index and absence of other disorders causing hirsutism (nonclassic 21-hydroxylase deficiency, congenital adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, thyroid disorders and hyperprolactinemia) as determined by appropriate tests (22-24). Transabdominal or transvaginal ovarian ultrasound was performed on all patients and enlarged, cystic ovaries were detected in most PCOS patients (25-27). Idiopathic hirsutism (IH) was diagnosed as previously described (24,28-32) in hirsute patients with regular, ovulatory cycles (luteal phase progesterone levels higher than 3.8 ng/ml), normal androgen levels, and without any known underlying disease (n=31). The study



protocol was approved by the local Ethics Committee (IRB-equivalent), and written informed consent was obtained from all subjects.

### ***Study protocol***

Anthropometric measurements included body weight, height, waist circumference, waist-to-hip ratio (WHR) (waist circumference recorded at the narrowest point or at the umbilicus, and hip circumference at the level of the greater trochanter), and BMI (current weight in kg divided by height in m<sup>2</sup>). Hirsutism was scored by the original method of Ferriman and Gallwey (33). Blood pressure was measured in the supine position after a 10 minute rest. Metabolic syndrome was defined when at least three out of the five following criteria were present: waist circumference > 88cm, triglycerides  $\geq$  150mg/dl, HDL-c < 50 mg/dl, blood pressure  $\geq$  130/85 mmHg, fasting glucose 110-126 mg/dl and/or 2-h glucose on oral glucose tolerance test (OGTT) 140-199 mg/dl. In addition, the presence of diabetes did not exclude a diagnosis of metabolic syndrome (34).

Hormonal and metabolic variables were assessed between days 2 and 10 of the menstrual cycle or on any day when the patients were amenorrheic. After an overnight fast, blood samples were drawn from an antecubital vein for determination of plasma lipids at baseline and glucose and insulin before and 2 hours after the ingestion of 75g of oral glucose (OGTT). Blood samples were also drawn for hormonal measurements: LH, SHBG and total testosterone (TT). All samples were obtained between 8 and 10 a.m.

The free androgen index (FAI) was estimated by dividing TT (nmol/L) by SHBG (nmol/L) x 100. Homeostasis Model Assessment (HOMA) was calculated by

multiplying insulin ( $\mu\text{IU/ml}$ ) by glucose ( $\text{mmol/l}$ ) and dividing this product by 22.5 (35).

### ***Assays***

Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and glucose were determined by colorimetric-enzymatic methods using the Bayer 1650 Advia System. LDL cholesterol was determined indirectly using the formula  $\text{LDL} = \text{total cholesterol} - \text{HDL} + \text{triglycerides} / 5$ . Serum LH was measured by a specific immunometric assay (Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles) with sensitivity of 0.05 mIU/ml for LH, and intra- and interassay CV of 3.6% and 6.7%, respectively, for LH. Total serum testosterone (T) levels were measured with the RIA method (ICN, Costa Mesa, CA) with an intra- and interassay CV of 10% and 11.6%, respectively. SHBG was measured by chemiluminescent enzyme immunoassay (DPC, Los Angeles, CA) with an sensitivity of 0.2 nmol/L, and intra- and interassay CV of 6.1% and 8.0%, respectively. Serum insulin levels were measured with an electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) with sensitivity of 0.20  $\mu\text{IU/ml}$  and intra- and interassay CV of 1.8% and 2.5%, respectively.

### ***Single nucleotide polymorphism (SNP) study***

In addition to serum samples, whole blood samples were collected from all women. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes following the technique described by Miller et al. (36).

Three *CAPN10* polymorphisms were analyzed: SNP-43, SNP-19 and SNP-63, as described by Haddad et al (21). SNP-43 (*CAPN10*-g.4852G/A) was genotyped employing one common primer and two size-differentiated allele-specific primers. Nucleotide mismatches were introduced to improve allele specificity where

necessary, and allele-specific primer concentrations were adjusted to compensate for the different PCR efficiencies of the two amplifications (21). PCR products for SNP-43 show a 134 bp allele and a 152 bp allele.

SNP-19 (*CAPN10*-g.7920indel32bp) is an insertion/deletion polymorphism and after PCR amplification two alleles are obtained, with a difference of 32 bp (allele 1: 155; allele 2: 187). SNP-63 (*CAPN10*-g.1637C/T) was typed using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR technique (*HhaI* restriction enzyme, New England Biolabs, Inc, Beverly, MA, USA), producing a 162 bp fragment (allele 1) and a 192 bp fragment (allele 2).

The PCR reactions were performed using Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Each reaction sample (50  $\mu$ l) contained 50 ng of genomic DNA, 0.2 U Taq DNA polymerase, 5% dimethylsulfoxide (DMSO), 1X PCR buffer [16 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mmol/L Tris-HCL, pH 8.4; 0.01% Tween 20], 200  $\mu$ mol deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP), and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The primers used for amplification are those described by Haddad *et al* (21). Amplifications were performed using an automated thermocycler (MJ Research Inc., Watertown MA, USA) under the following conditions: hot start, 12 min at 96°C; 35 cycles of 30 s at 96°C; 30 s with annealing temperatures of 56°C for SNP-43, 60°C for SNP-19 and 62° C for SNP-63; extension cycle of 30 s at 72°C and final extension cycle of 10 min at 72° C. Digestion of SNP-63 PCR products was performed with 3U of *HhaI* during 2 hours at 37°C. The quality of the PCR products was assessed using 3% or 4% agarose gel electrophoresis.

### ***Statistical Analysis***

Results are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD), or median and interquartile range. Comparisons between group means were analyzed by Student's t test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test; comparisons between median values were analyzed using the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis' test. Log<sub>10</sub> transformation was used to normalize distribution of non-Gaussian variables in order to allow forward stepwise linear regression analysis.  $\chi^2$  was calculated for comparison of allelic frequencies in PCOS and IH patients for all *CAPN10* polymorphisms. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SSPS, Chicago, IL, USA). Data were considered to be significant at P<0.05.

### **Results**

Table 1 shows the clinical, hormonal and metabolic profile of hirsute patients. Hirsutism scores were similar in both groups, but PCOS patients presented greater BMI and waist circumference than IH patients. As expected, androgens and LH levels were also higher in patients with PCOS. The differences observed between the groups in terms of lipid profile and SHBG were lost when data were adjusted for BMI. In contrast, even when controlled for BMI, fast insulin levels, HOMA index and FAI remained significantly higher in PCOS patients.

Metabolic syndrome was present in 17 (29.3%) of 61 PCOS subjects compared with 2 (7.1%) of 31 IH subjects (P=0.026). Although IH patients were older than PCOS patients, there was no difference in the prevalence of hypertension (23% in PCOS vs. 16.7% in IH, P=0.59), impaired glucose tolerance (5.49% in PCOS vs.

0.62% in IH,  $P=0.53$ ) and type 2 diabetes (1.22% in PCOS vs. 0.31% in IH,  $P=0.84$ ) between the groups.

All genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium law. The frequency of polymorphic alleles and genotype distribution at three loci within the *CAPN10* gene (UCSNP-43, UCSNP-19, and UCSNP-63) were similar in the PCOS and IH groups (Table 2). However, the presence of specific polymorphic variants was related with a worst metabolic profile in PCOS patients: the A allele in UCSNP-43 determined a significantly higher level of LDL-c ( $p<0.001$ ) compared to the wild-type G allele in PCOS and to both polymorphic A and wild-type G alleles in IH. Similarly, in PCOS the deleted allele (2R) in UCSNP-19 was associated with increased LDL-c in comparison to all alleles in IH ( $P =0.002$ ) (Table 3).

In contrast, while variables related to insulin resistance (such as fasting insulin levels and HOMA) or to hyperandrogenism (LH levels, androgens and hirsutism score) were associated with the presence of PCOS, they did not differ between *CAPN10* alleles (Table 4).

Table 5 shows data concerning the association between presence of metabolic syndrome and UCSNP-43 and UCSNP-19 polymorphisms in *CAPN10*. Although no association was observed when the entire sample of hirsute patients was analyzed, both polymorphic alleles were associated with metabolic syndrome in the PCOS group. No association was observed between phenotypic PCOS traits and the polymorphic T allele in UCSNP-63.

## Discussion

In the present study, polymorphic variants in UCSNP-43 and UCSNP-19 were related to an unfavorable lipid profile and higher prevalence of metabolic syndrome in PCOS patients in comparison to IH patients. To our knowledge, this is the first report to describe this association. In contrast, *CAPN10* gene polymorphisms UCSNP-43, UCSNP-19, and UCSNP-63 were not associated with PCOS etiology or variables strictly related to insulin resistance. This could be due to a failure of the current methods to properly detect insulin resistance: although enhanced fasting insulin has been a criterion to diagnose metabolic syndrome, and HOMA index has a good correlation with the gold-standard hyperinsulinemic–euglycemic clamp technique (37), both methods lack precision, since diagnostic cutoff levels with significant clinical correlation to glucose intolerance/ T2DM risk have not been established.

The determination of the PCOS genetic background has been a challenge to all investigators with an interest in the pathophysiology of this syndrome. The *CAPN10* gene is a strong candidate to explain the phenotypic characteristics that are more prevalent in PCOS patients than in the general population, such as obesity-independent insulin resistance (38,39). In the present cross-sectional study, hirsute patients that fulfilled the inclusion criteria were sequentially allocated to the study. Thus, because no selection was done, PCOS patients ended up being younger and more frequently obese than IH women. Moreover, the PCOS women presented higher insulin levels and HOMA regardless of BMI. However, these clinical features strictly reflect the high risk nature of PCOS metabolically speaking and underscore the relevance of searching for candidate genes for metabolic comorbidities in these women.

Interestingly, the observed absence of association of *CAPN10* gene polymorphisms and clinical phenotype in patients with IH is similar to the

observations made in control groups, as described by others and shown in Table 2 (19,21). IH patients are an intriguing group of hyperandrogenic women who exhibit no increase in androgen secretion, but rather abnormalities in androgen metabolism and action (29,40,41). The fact that their hormonal and metabolic profile is similar to that of non-hirsute healthy patients, while at the same time they have the same complaints and their hirsutism is similar to that of PCOS, makes this an especially apt control group for PCOS studies (24,28,30,31,32).

Previous studies with *CAPN10* polymorphisms have shown a genetic association between *CAPN10* and hyperandrogenic features. Escobar et al. (18) evaluated UCSNP- 45, UCSNP-44 and UCSNP-43 *CAPN10* polymorphisms in a Spanish population, and observed that regardless of etiology, hirsute patients who were homozygous for the polymorphic A allele in UCSNP43 had a higher hirsutism score. They also suggested that the UCSNP-45 C allele may be associated with IH (16 patients), but this finding must be confirmed in larger groups. Gonzales et al. (20) reported that hirsute PCOS patients have a higher frequency of the polymorphic UCSNP-44 C variant when compared with healthy women, but did not observe an association between UCSNP-43, UCSNP-19 and UCSNP-63 and hyperandrogenic features. Taken together, our results and those of Gonzales et al. support the idea that these polymorphic variants are not associated with risk for hirsutism in PCOS patients. In addition, the increased androgen levels in PCOS are related to the etiology of hirsutism (PCOS vs. IH), rather than to genetic association.

Although the association between *CAPN10* gene polymorphisms and T2DM has been the preferred focus in population studies, secondary end-points such as associations with dyslipidemia, hypertension and obesity have been also reported. In a Japanese population, polymorphic variants of UCSNP-44 and UCSNP-43 were

related to dyslipidemia but not to DM2 (42). Moreover, in PCOS patients, the 1121 risk haplotype (UCSNP-44, -43, -19 and -63) was frequently found in dyslipidemic (total cholesterol > 200 mg/dl) subjects (20). Those studies, however, do not mention whether LDL-c levels differ between the groups. Our data show that the presence of polymorphic variants in UCSNP-43 and UCSNP-19 *CAPN10* gene in southern Brazilian PCOS patients was related to an unfavorable lipid profile, particularly regarding LDL-c levels. The impact of this association is reinforced by the fact that even when only overweight and obese patients (BMI  $\geq 25$ ) were analyzed after adjustment for WHR, LDL-c levels remained significantly higher in the presence of these polymorphisms in the PCOS group. This means that the association between the UCSNP-43 and UCSNP-19 *CAPN10* gene polymorphisms and metabolic syndrome is actually related to the presence of PCOS, and not to obesity or central adiposity. In contrast, we did not find any association between metabolic variables and genomic variability of *CAPN10* gene in IH patients.

Other studies have shown positive results for *CAPN10* polymorphisms only in isolated components of the metabolic syndrome, such as higher triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of *CAPN10*, without association with obesity (43) Shima et al (44) reported an association of polymorphic deleted allele (2R) in the UCSNP-19 locus with elevated BMI and hemoglobin A(1c) in a Japanese population. In the present study, the failure to detect significant differences for isolated metabolic syndrome components may be due to the fact that PCOS subjects were younger than those from the IH group. In this sense, while hypertension may occur in some women with PCOS at post-pubertal years, sustained hypertension usually develops later in women with PCOS (45,46).



Since insulin plays both direct and indirect roles in the pathogenesis of hyperandrogenemia in PCOS, and insulin resistance is the most accepted hypothesis to explain the pathophysiology of metabolic syndrome, it would be relevant to find a molecular connection between insulin resistance and PCOS. However, an accurate and practical clinical test for detecting insulin resistance is still missing. In turn, our data showing an association between higher prevalence of polymorphic variants of *CAPN10* gene and metabolic syndrome supports the notion that a clustered syndrome diagnosis related to metabolic features, together with genetic alterations, would be more effective to identify PCOS patients at increased risk for cardiovascular disease than the use of a single, and in this case imprecise, variable.

In conclusion, the present data show an association between higher prevalence of polymorphic alleles in two of the studied variants of the *CAPN10* gene and unfavorable LDL-c levels and metabolic syndrome in PCOS, and suggest that UCSNP-43 and UCSNP-19 influence the PCOS metabolic phenotype.

## References

1. **Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A** 1999 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* 84:165–169
2. **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J** 1999 Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22:141–146
3. **Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A** 1987 Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 65:499–507
4. **Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G** 1992 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* 57:505–513
5. **Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs HS** 2000 Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol* 52:595–600
6. **Patel Y, Lane DM** 1999 Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:1279–1285
7. **Smith LK, Rice KM, Garner CW** 1996 The insulin-induced down-regulation of IRS1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease. *Mol. Cell. Endocrinol* 122:81–92
8. **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** 2000 Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26:163–175
9. **Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST, Tufa J, Viali S, Deka R** 2001 Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association. *Am J Hum Genet* 69:1236–1244
10. **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** 2001 Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 69:544–552
11. **Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, Hanis CL, Hasstedt SJ** 2002 Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87:650–654
12. **Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS** 2002 Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes* 51:1644–1648
13. **Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M** 2002 Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* 51:247–250

14. **Schwarz PEH, Horikawa Y, Vcelak J, Selisko T, Rietzsch H, Bendlova B, Schulze J, Cox NJ** 2001 Genetic variation of *CAPN10* affects susceptibility to type 2 diabetes in German and Czech population. *Diabetes* 50 Suppl 2:A232
15. **Sun HX, Zhang KX, Du WN, Shi JX, Jiang ZW, Sun H, Zuo J, Huang W, Chen Z, Shen Y, Yao ZJ, Qiang BQ, Fang FD** 2002 Single nucleotide polymorphisms in *CAPN10* gene of Chinese people and its correlation with type 2 diabetes mellitus in Han people of northern China. *Biomed Environ Sci* 15:75–82
16. **Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J** 2003 Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 88:244–247
17. **Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ** 2002 Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1669–1673
18. **Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL** 2002 Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 77:581–587
19. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A** 2002 *CAPN10* alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3971–3976
20. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Ruiz RL, Favez O, Galan JJ, Herreros JÁ, Real LM, Ruiz A** 2003 Specific *CAPN10* Haplotypes Influence the Clinical Profile of Polycystic Ovary Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5529–5536
21. **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** 2002 Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2606–2610
22. **Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Kuttan F, Mauvais-Jarvis P** 1990 Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 70:642–646
23. **Azziz R, Dewailly D, Owerbach D** 1994 Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 78:810–815
24. **Spritzer PM, Oppermann-Lisboa K, Mattiello S, Lhullier F** 2000 Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol* 52:587–594
25. **Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HS** 1985 Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 2:1375–1379
26. **Herter LD, Magalhães JA, Spritzer PM** 1996 Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of Clinical Ultrasound*. 24:243–248
27. **The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group** 2003 Revised consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:19–25
28. **Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E** 2001 Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 16:1340–1346

29. **Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM** 2003 Gene expression of type 2 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids* 68:641–649
30. **Spritzer PM, Comim FV, Capp E, D’Avila AM** 2005 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*. 37(2):94–98
31. **Frajndlich R, Spritzer PM** 2005 Association between ovarian volume and serum insulin levels in ovulatory patients with idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 83(5):1561–1564
32. **Comim FV, Spritzer PM** 2004 Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:108–113
33. **Ferriman D, Gallwey JD** 1961 Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 21:1140–1148
34. **Executive Summary of Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)** 2001 *JAMA* 285:2486–2497
35. **Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ** 2000 Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2402–2410
36. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF** 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3):1215

37. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
38. **Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A** 1989 Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38:1165–1174
39. **Ibáñez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB, Zegher F** 2002 Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6):2870–2874
40. **Lobo RA, Goebelsmann U, Horton R** 1983 Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 57:393–397
41. **Serafini P, Lobo RA** 1985 Increased 5 alpha-reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 43: 74–78.
42. **Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T** 2002 Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147–152
43. **Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstrale M** 2004 Variation in the Calpain-10 Gene Is Associated with Elevated Triglyceride Levels and Reduced Adipose Tissue Messenger Ribonucleic Acid Expression in Obese Swedish Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89(7):3601–3605

44. **Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H** 2002 Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147–152
45. **Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A** 1992 Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction: evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71:599–606
46. **Glueck CJ, Papanna R, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L** 2003 Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 52:908–915



Table 1 Clinical, hormonal and metabolic characteristics of hirsute patients with PCOS and IH

	PCOS (n=61)	IH (n=31)	P	P <sup>a</sup>
Age(y)	20.62 ± 5.89	27.16 ± 10.61	0.003	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.12 ± 8.57	26.67 ± 5.85	0.005	
Waist circumference (cm)	93.70 ± 21.18	80.94 ± 11.76	0.001	
Hypertension <sup>b</sup>	14 (23%)	5 (16.7%)	0.59	
Fasting Glucose (mg/dL)	88.16 ± 11.5	87.45 ± 11.84	0.782	
2h - Glucose (mg/dL)	111.50 ± 30.84	98.53 ± 29.27	0.059	
Fasting Insulin (μU/mL) <sup>c</sup>	30.40 (17.15-40.7)	15.5 (7.77-22.50)	< 0.001	0.001
HOMA index <sup>c</sup>	6.20 (3.43-8.79)	3.71 (1.51-4.77)	< 0.001	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	193.39 ± 46.22	173.31 ± 25.81	0.012	0.23
HDL-c (mg/dL)	50.02 ± 10.96	50.0 ± 7.96	0.99	
LDL-c (mg/dL)	122.98 ± 41.87	105.21 ± 26.21	0.019	0.44
Triglycerides (mg/dL) <sup>c</sup>	113.5(70.2-139.7)	83 (56-99.5)	0.015	0.253
LH (IU/L) <sup>c</sup>	5.57 (3.02-9.38)	3.0 (1.74-4.59)	0.001	
Ferriman-Gallwey score <sup>c</sup>	14.5 (12-23)	16 (12-22)	0.99	
Total T (ng/mL)	1.04 ± 0.42	0.62 ± 0.20	< 0.001	0.14
SHBG (nmol/L) <sup>c</sup>	19.1 (12.3-32.32)	31.1 (20.3-45.05)	0.01	
FAI <sup>c</sup>	0.17 (0.09-0.34)	0.07 (0.04-0.09)	< 0.001	0.002

<sup>a</sup>P adjusted for BMI (linear regression)

<sup>b</sup>Hypertension = blood pressure ≥130/≥85 mmHg

Values are expressed as mean ± SD, Student T-test or <sup>c</sup>median and quartiles 25-75, Mann-Whitney test

	Gonzales <i>et al</i> (19)		Haddad <i>et al</i> (21)		Present work	
	PCOS (n=55)	Control (n=93)	PCOS (n=185)	Control (n=585)	PCOS (n= 61)	IH (n=31)
<b>UCSNP- 43</b>						
GG	0.563	0.580	0.584	0.562	0.409	0.516
GA	0.345	0.344	0.371	0.368	0.442	0.419
AA	0.090	0.075	0.045	0.069	0.131	0.032
	<i>P=0.97</i>		<i>P=0.49</i>		<i>P=0.271</i>	
<b>UCSNP-19</b>						
3R3R	0.236	0.161	0.148	0.163	0.065	0.193
3R2R	0.472	0.365	0.521	0.454	0.557	0.419
2R2R	0.290	0.462	0.331	0.383	0.295	0.387
	<i>P=0.1</i>		<i>P=0.49</i>		<i>P=0.126</i>	
<b>UCSNP-63</b>						
CC	0.781	0.817	0.835	0.854	0.557	0.741
CT	0.163	0.161	0.165	0.142	0.163	0.161
TT	0.036	0	0	0.004	0.016	0.032
	<i>P=0.71</i>		<i>P=0.62</i>		<i>P=0.841</i>	

Table 2 Comparison of *CAPN10* genotype frequency studies in PCOS patients

Table 3 Influence of *CAPN10* UCSNP-43 and UCSNP-19 polymorphisms in variables associated with metabolic syndrome

Alleles	UCSNP-43				UCSNP-19			
	PCOS		IH		PCOS		IH	
	G	A	G	A	3R	2R	3R	2R
Chromosomes (n)	77	43	44	16	42	70	25	37
Waist Circunference (cm)	91.1±21.3	97.4±20.7	82.9±11.7	75.8±10.9	88.2±20.3	91.1±19.9	87.2±15.4	93.4±19.1
Hypertension	15 (19.5%)	11 (25.6%)	7 (16.7%)	3 (18.7%)	8 (19%)	18 (25.7%)	2 (8.7%)	8 (21.6%)
Fasting Glucose (mg/dL)	87.9±12.4	88.5±9.8	87±10.8	89.1±14.9	86.9±10.7	87.8±11.3	87.6±10.5	87.4±12.6
2h-Glucose (mg/dL)	109.5±31	113.9±30.8	97.3±27.4	104.7±34.6	105.3±30.7	105.5±29.1	109.5±33.5	114.9±31.9
Total cholesterol (mg/dL)	186.3±41.5	204.2±41.5	168.5±26.9	182.5±19	183.3±42.2	195.3±48.6	165.9±25.8	177.5±24.3
HDL-c (mg/dL)	51.7±11.5	47.1±9.6	49.5±8.1	51.6±7.9	50.7±11.5	49.4±10.9	47.8±8.3	51.6±7.4
LDL-c (mg/dL)	115.3±38.9	136.3±44.5 <sup>a</sup>	100.4±27.1	106.5±30.9	110.1±33.9	128.1±46.0 <sup>b</sup>	101.6±24.3	103.3±30
Triglycerides (mg/dL)	106.3 (70-131)	125 (70-121)	78 (53-99.5)	90 (59-121)	98 (70.5-129)	104 (65-142)	76 (53-104)	89 (59-107)

Comparison between groups were made by One-Way ANOVA

<sup>a</sup> P < 0.001 PCOS A allele versus all other groups

<sup>b</sup> P = 0.002 PCOS 2R allele versus IH both alleles

Table 4 Variables associated with insulin resistance and hyperandrogenism and presence of *CAPN10* UCSNP-43 and UCSNP-19 polymorphisms

Alleles	UCSNP-43				UCSNP-19			
	PCOS		IH		PCOS		IH	
	G	A	G	A	3R	2R	3R	2R
Chromosomes	77	43	44	16	42	70	25	37
(n)								
Fasting Insulin ( $\mu$ U/ml)	28.5 (15.3- 41.8) <sup>a</sup>	30.4 (18.5- 40.9) <sup>a</sup>	13.0 (7.8- 22.4)	17.2 (7.2-23.1)	23.9 (14.5- 36.8)	28.5 (17.5-41.6)	17.4 (7.9-21.5)	15.5 (7.0- 23.4)
HOMA index	5.3 (3.2- 8.8) <sup>a</sup>	6.3 (3.6- 8.8) <sup>a</sup>	2.9(1.5-4.6)	4.1 (1.5-5.2)	4.8 (3.0-7.8)	6.0 (3.6-9.5)	3.7 (1.6-4.34)	3.6 (1.5-5.0)
Ferriman- Gallwey	14 (12-23.5)	16 (12- 22.5)	16 (12.7- 22)	15 (11.2-16.7)	16 (13-22)	16 (12-22)	15 (11.5-23.5)	13 (12- 16.5)
LH (IU/L)	6.2 (2.9-11)	4.11 (3.3- 8.5)	2.9 (1.6- 4.2) <sup>b</sup>	3.4 (2.5-5.2) <sup>a</sup>	6.9 (2.9-13.3)	5.3 (3.1-8.5)	2.8 (1.6-4.8)	3 (2.4-4.2)
Total T (ng/mL)	1.03 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.20	0.56 $\pm$ 0.14	0.96 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	1.05 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	0.63 $\pm$ 0.22	0.63 $\pm$ 0.21
FAI	0.15 (0.08- 0.3) <sup>a</sup>	0.18 (0.1- 0.36) <sup>a</sup>	0.06 (0.03- 0.09)	0.06 (0.03-0.08)	0.15(0.09- 0.24)	0.18(0.11-0.34)	0.06(0.04-0.089)	0.07 (0.04- 0.09)

Comparisons between groups were made by One-Way ANOVA.

<sup>a</sup> P < 0.001 vs IH G and A allele

<sup>b</sup> P < 0.001 vs PCOS G and A allele

<sup>c</sup> P < 0.001 vs IH 3R and 2R allele

Table 5 Presence of Metabolic Syndrome (MS) and association with *CAPN10* UCSNP-43 and UCSNP-19 polymorphisms

	All patients		PCOS	
UCSNP 43	G	A	G	A
MS +	18 (16.2%)	16 (28.1%)	14 (20%)	16 (38.6%)
MS -	93 (83.8%)	41 (71.9%)	57 (80%)	27 (61.4%)
	P=0.103		P=0.049	
UCSNP19	3R	2R	3R	2R
MS+	8 (13.4%)	24 (23.5%)	6 (15.8%)	22 (32.4%)
MS-	52 (86.6%)	78 (76.5%)	32 (84.2%)	46 (67.6%)
	P=0.157		P=0.07	

Standard Pearson  $\chi^2$ : polymorphic variant vs normal allele in both groups

### **III. ARTIGO EM PORTUGUÊS**

#### **Associação entre os polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene da calpaína (*CAPN10*) e síndrome metabólica em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (PCOS)**

Polimorfismos da calpaína-10 e PCOS

<sup>1,2</sup>Denusa Wiltgen, <sup>2</sup>Lúcia Furtado, <sup>2,3</sup>Maria Beatriz F Kohek, <sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer

<sup>1</sup> Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>2</sup> Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul), e PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa).

## **Resumo**

Contexto: A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma doença endócrina heterogênia com susceptibilidade individual determinada por fatores de risco ambientais e genéticos. As pacientes com PCOS apresentam uma maior prevalência de resistência insulínica, hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estudos de associação revelam que o gene da calpaína 10 (*CAPN10*) está relacionado com a predisposição genética à DM2 em diferentes populações. Recentemente estudos têm avaliado o gene da *CAPN10* nas pacientes com PCOS sugerindo que diferentes alelos podem ter papel na susceptibilidade desta síndrome.

Objetivo: Verificar a associação entre polimorfismos do gene da *CAPN10* (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) e o diagnóstico de PCOS em uma amostra de pacientes hirsutas do sul do Brasil e avaliar sua influência em variáveis clínicas e metabólicas que compõe a síndrome metabólica.

Delimitação: Estudo transversal comparando pacientes hirsutas com PCOS e hirsutismo idiopático (HI: ciclos ovulatórios, níveis de androgênios normais e hirsutismo isolado).

Resultados: A frequência dos alelos polimórficos (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) foram similares em PCOS e HI. Contudo, nas pacientes com PCOS, as variantes polimórficas nos UCSNP-43 e UCSNP-19 correlacionaram-se com níveis elevados de LDL-c ( $P < 0.01$ ) e síndrome metabólica (UCSNP-43,  $P = 0.049$ ; UCSNP-19,  $P = 0.07$ ). Estes achados não foram vistos nas pacientes HI. As variáveis relacionadas com resistência insulínica ou a hiperandrogenismo estão associadas com o diagnóstico etiológico PCOS, independentemente das variáveis genéticas da *CAPN10*. Não foi encontrada associação entre o UCSNP-63 e traços fenotípicos de PCOS.

Conclusão: Estes resultados fornecem evidência que os polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene da *CAPN10* podem influenciar o fenótipo metabólico das pacientes com PCOS.

Palavras-chave: resistência insulínica, androgênios, hirsutismo, síndrome metabólica, PCOS, polimorfismos genéticos, *CAPN10*.

## Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma doença endócrina complexa e prevalente caracterizada por disfunção ovulatória e hiperandrogenismo. Além disso as pacientes com PCOS apresentam distúrbios metabólicos como dislipidemia, resistência insulínica e intolerância à glicose, os quais aumentam o risco de desenvolvimento de DM2 e, possivelmente, de doença cardiovascular (1-5). Contudo os mecanismos envolvidos na etiologia da PCOS e sua associação com resistência insulínica ainda não estão elucidados. As evidências correntes indicam que a PCOS é uma doença multifatorial e a susceptibilidade individual é determinada por um conjunto de fatores de risco genéticos e ambientais.

As calpaínas são uma família de proteases cisteína encontradas em todos os tecidos. Estudos experimentais sugerem que estas enzimas podem estar implicadas na diferenciação dos adipócitos, na modulação da secreção e ação da insulina e no metabolismo dos ácidos graxos livres (6,7). O gene da calpaína-10 (*CAPN10*), o qual consiste em 15 éxons localizados no cromossomo 2q37.3, foi o primeiro gene candidato para DM2. Horikawa e col. (8) relataram que três polimorfismos no gene da *CAPN10* (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) definem o haplotipo de alto-risco para DM2 em Mexicanos-americanos e Europeus do norte (aumento de 3x no risco). Após esta publicação, muitos autores têm estudado a associação entre frequência populacional de variantes polimórficas da *CAPN10* e prevalência de DM2 (9-16). Recentemente, alguns estudos têm avaliado o gene da *CAPN10* em pacientes com PCOS. Embora não se tenha observado uma clara relação entre características clínicas, hormonais e metabólicas neste grupo especial de pacientes, a análise molecular sugere que alelos da *CAPN10* podem participar na susceptibilidade genética à PCOS (17-21). Contudo, estes estudos reportam a distribuição de haplotipos e genótipos dos polimorfismos UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 da *CAPN-10*, sem avaliar a possível influência de cada variante polimórfica no desenvolvimento da PCOS ou de suas características clínicas.

Dito isto, os objetivos do presente estudo são: 1) avaliar se polimorfismos do gene da *CAPN10* (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) estão relacionados com



PCOS em uma amostra de pacientes hirsutas do sul do Brasil; e 2) avaliar a influência destas variantes genéticas nas características clínicas e bioquímicas da síndrome metabólica nestas pacientes.

## **Pacientes e Métodos**

### *Pacientes*

A amostra foi constituída por 92 mulheres hirsutas recrutadas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Nenhuma paciente estava em uso de medicações que interferissem em seus níveis hormonais por pelo menos 3 meses antes do estudo. O diagnóstico de PCOS (n=61) foi definido pela presença de ciclos menstruais oligo/amenorreicos (<9 ciclos/ano), níveis elevados de testosterona total e/ou índice de androgênios livres, e ausência de outras patologias causadoras de hirsutismo (deficiência não-clássica de 21-hidroxilase, hiperplasia adrenal congênita, Síndrome de Cushing, alterações tireoidianas e hiperprolactinemia), como determinado em testes apropriados (22-24). Todas pacientes foram submetidas a ecografia ovariana transabdominal ou transvaginal e, na maioria das pacientes com diagnóstico de PCOS, observamos ovários císticos e aumentados de volume (25-27). Hirsutismo idiopático (HI) foi diagnosticado como previamente descrito (24,28-32) em pacientes hirsutas com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (níveis de progesterona na fase luteal maiores que 3.8 ng/dl), níveis normais de androgênios e exclusão de outras doenças (n=31). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local, sendo obtido consentimento informado de todas pacientes.

### *Métodos*

Medidas antropométricas como peso corporal, altura, circunferência abdominal, relação cintura-quadril (ICQ) (circunferência da cintura no local mais estreito ou na cicatriz umbilical, circunferência do quadril no nível do trocanter maior) e índice de massa corporal (IMC) (peso atual em kg dividido pela altura em m<sup>2</sup>). A graduação do hirsutismo foi realizada através da escala de Ferriman e Gallwey (33). Medidas da pressão arterial foram obtidas na posição supina após 10 min de

repouso. Síndrome metabólica foi definida quando 3 dos seguintes 5 critérios estavam presentes: circunferência abdominal > 88cm, triglicerídeos  $\geq$  150mg/dl, HDL-c < 50 mg/dl, pressão arterial  $\geq$  130/85 mmHg, glicemia de jejum entre 110-126 mg/dl e/ou glicose 2-h após teste de tolerância à glicose (TTG) entre 140-199 mg/dl. Além disso, a presença de DM2 não excluiu o diagnóstico de síndrome metabólica (34).

Variáveis hormonais e metabólicas foram avaliadas entre o 2º e 10º dia do ciclo menstrual ou em qualquer dia na presença de amenorréia, no período de 8 a 10 horas da manhã. Após 12h de jejum, Amostras sanguíneas da fossa antecubital foram coletadas após 12h de jejum e submetidas a dosagens hormonais: LH, SHBG e testosterona total (TT).

O índice de androgênios livres (IAL) foi estimado pela divisão da TT (nmol/L) pela SHBG (nmol/L) x 100. Índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) foi calculado através da multiplicação da insulina ( $\mu$ IU/ml) pela glicose (mmol/l) , dividindo o produto por 22.5 (35).

### *Ensaio*

Dosagens do colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose foram determinadas por métodos enzimáticos-colorimétricos utilizando o sistema Bayer 1650 Advia System. A determinação do LDL colesterol foi realizada de maneira indireta através da fórmula  $LDL = \text{colesterol total} - HDL + \text{triglicerídeos} / 5$ . LH sérico foi mensurado por ensaio imunométrico específico (*Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles*) com sensibilidade de 0.05 mIU/ml para o LH, intra- e inter-ensaio com valor de confiança de 3.6% e 6.7%, respectivamente, para o LH. Já a testosterona total (TT) foi medida com método de radioensaio (*ICN, Costa Mesa, CA*) com variação intra- e inter-ensaio de 10% e 11.6%, respectivamente. SHBG foi obtida pelo método de quimioluminescência enzimática (*DPC, Los Angeles, CA*) com sensibilidade de 0.2 nmol/L, e variação intra e interensaio de 6.1% e 8.0%, respectivamente. Os níveis de insulina foram avaliados por radioensaio de eletroquimioluminescência (*Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim*) com sensibilidade de 0.20  $\mu$ IU/ml e variação intra- e inter-ensaio de 1.8% e 2.5%, respectivamente.

### *Avaliação molecular*

As amostras de DNA genômico foram extraídas de leucócitos periféricos a partir da coleta de 4 ml de sangue total em todas as pacientes, conforme técnica descrita por Miller e col. (36).

Foram analisados 3 polimorfismos (SNP) da *CAPN10* : SNP-43, SNP-19 e SNP-63, como descrito por Haddad e col. (21). SNP-43 (*CAPN10*-g.4852G/A) foi genotipado aplicando-se um primer comum e dois primers alelo-específicos diferenciados pelo tamanho. Introduzimos trocas de nucleotídeos para melhorar a especificidade do alelo no local necessário, assim como as concentrações de cada primer foram ajustadas para compensar a eficiência desigual da PCR (*polymerase chain reaction*) para estas duas ampliações (21). O produtos da PCR para o SNP-43 são um alelo com 134bp e um segundo com 152bp.

SNP-19 (*CAPN10*-g.7920indel32bp) é um polimorfismo de inserção/deleção e após amplificação por PCR dois alelos foram obtidos com uma diferença de 32bp (alelo 1 : 155bp; alelo 2: 187).

SNP-63 (*CAPN10*-g.1637C/T) foi tipado pela técnica RFLP-PCR (*restriction fragment lenght polymorphism*), utilizando-se a enzima de restrição *HhaI* (*New England Biolabs, Inc, Beverly, MA, USA*), produzindo um fragmento com 162bp (alelo1) e outro com 192bp (alelo 2).

As reações de PCR foram realizadas utilizando Taq DNA polimerase (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Cada reação (50µl) continha 50ng de DNA genômico, 0.2 U Taq DNA polimerase, dimetilsulfoxido 5% (DMSO), 1 x tampão de PCR (16 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mmol/L Tris-HCL, pH 8,4; 0,01% Tween 20), 200 µmol de trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP) e 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Os primers de amplificação são os mesmos descritos por Haddad e col. (21). As ampliações foram feitas em termociclador automatizado (*MJ Research Inc., Watertown MA, USA*) nas seguintes condições: desnaturação inicial de 12 min a 96°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação (96°C por 30 seg), com temperaturas de anelamento de 56° C para o

SNP-43, 60°C para o SNP-19 e 62°C para o SNP-63 por 30 seg; ciclo de extensão de 30 seg a 72°C e extensão final de 10 min a 72°C. A digestão dos produtos do SNP-63 com a enzima *HhaI* (3U) foi realizada através da incubação da mistura à 37°C por 2 horas. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 3% ou 4%, coradas com brometo de etídio e visualizadas e fotografadas à luz UV.

### *Análise estatística*

Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil. Comparações entre médias dos grupos foram analisadas através do teste "t" de Student ou pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey; comparações entre medianas foram avaliadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney U ou Kruskal-Wallis. Aplicamos transformação logarítmica para os dados não-paramétricos na realização da análise de regressão linear. O teste do  $\chi^2$  foi utilizado para comparar as frequências alélicas dos polimorfismos da *CAPN10* entre as pacientes PCOS e HI. A análise estatística foi realizada com o pacote *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, USA), sendo considerado como significante um valor de  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

A tabela 1 mostra as características clínicas, hormonais e metabólicas das pacientes hirsutas. O grau de hirsutismo foi similar em ambos grupos, porém as pacientes com PCOS apresentam maior IMC e maior circunferência abdominal (cintura) quando comparadas às pacientes com HI. Como esperado, os níveis de androgênios e de hormônio luteinizante (LH) encontram-se mais elevados no grupo PCOS. As diferenças encontradas entre os grupos quanto ao perfil lipídico e níveis de SHBG foram perdidas após ajuste dos dados por IMC. Contudo, mesmo após controle por IMC, os níveis de insulina basal, o índice HOMA e o índice de androgênios livres permaneceram significativamente maiores nas pacientes com PCOS.

Síndrome metabólica foi diagnosticada em 29.3% (17/61 pacientes) das mulheres com PCOS e em 7.1% (2/31 pacientes) das mulheres com HI ( $P=0.026$ ). As

pacientes com HI apresentam idade mais avançada em relação às PCOS, mas esta diferença não interferiu na prevalência de HAS (23% nas PCOS vs 16.7% nas HI,  $P=0.59$ ), intolerância à glicose (5.49% nas PCOS vs. 0.62% nas HI,  $P=0.53$ ) e DM2 (1.22% nas PCOS vs. 0.31% nas HI,  $P=0.84$ ).

Todas frequências genótípicas estão de acordo com a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência dos alelos polimórficos e a distribuição genotípica nos três *loci* do gene da *CAPN10* (UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63) não diferiram entre os grupos PCOS e HI (Tabela 2). Entretanto, a presença de variantes polimórficas específicas estão relacionadas com perfil metabólico desfavorável nas pacientes com PCOS: a presença do alelo A no UCSNP-43 determinou maiores níveis de LDL-c quando comparados com o alelo selvagem G nas PCOS e com ambos alelos, polimórfico e selvagem, nas pacientes HI ( $p<0.001$ ). Da mesma forma, a presença do alelo "deletado"(2R) no UCSNP-19 nas pacientes com PCOS foi associado a maiores níveis de LDL-c comparados com todos alelos nas HI ( $P=0.002$ ) (Tabela 3).

As variáveis relacionadas com resistência insulínica, (insulina basal e HOMA), e hiperandrogenismo, (níveis de LH, androgênios e graduação de hirsutismo) não diferiram quanto à frequência de alelos polimórficos da *CAPN10*, mas sim quanto à presença de PCOS (Tabela 4).

A tabela 5 mostra os resultados entre associação de síndrome metabólica e os polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 da *CAPN10*. Embora não tenha sido observada associação na análise da amostra total (pacientes hirsutas), ambos alelos polimórficos estão associados com a presença de síndrome metabólica nas pacientes com PCOS.

Não foi encontrada associação do alelo polimórfico T no UCSNP-63 com características fenotípicas das pacientes com PCOS.

## Discussão

No presente estudo a presença de variantes polimórficas nos UCSNP-43 e UCSNP-19 estão relacionadas com perfil lipídico desfavorável e maior prevalência de síndrome metabólica nas pacientes com PCOS quando comparadas às HI. Até onde conhecemos, este é o primeiro estudo a descrever esta associação. Contudo, os polimorfismos UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 do gene da *CAPN10* não estão associados com a etiologia da PCOS ou com variáveis relacionadas estritamente à resistência insulínica. Acreditamos que este achado negativo seja devido a não adequação dos métodos correntes para o diagnóstico de resistência insulínica: embora níveis elevados de insulina sejam essenciais na etiologia da síndrome metabólica e o índice HOMA apresente boa correlação com a técnica padrão-ouro (técnica do "clump" euglicêmico-hiperinsulinêmico) para o diagnóstico de resistência insulínica, ambos são falhos pois ainda não foram estabelecidos pontos de corte para estas duas variáveis com boa correlação clínica na predição de casos de intolerância à glicose e DM2.

A determinação da base genética da síndrome dos ovários policísticos têm sido um desafio para todos os investigadores com interesse no descobrimento da fisiopatologia desta síndrome. O gene da *CAPN10* é um forte candidato pois poderia explicar características que são mais prevalentes nas pacientes com PCOS quando comparadas à população geral como, por exemplo, a resistência insulínica independente da obesidade (38, 39). Neste estudo transversal, pacientes hirsutas que preencheram os critérios de inclusão foram sequencialmente alocadas para a análise. Como não houve seleção prévia de pacientes, o grupo PCOS é mais jovem e mais frequentemente obeso do que o grupo HI. Além disso, as mulheres com PCOS apresentam maiores níveis de insulina e HOMA independente do IMC. Entretanto, estas características clínicas refletem o maior risco natural das pacientes com PCOS do ponto de vista metabólico e certamente reitera a relevância da busca de genes candidatos que expliquem estas alterações.

Nas pacientes com hirsutismo idiopático não se observou associação entre polimorfismos do gene *CAPN10* e características clínicas, achado similar aos de outros estudos que também não encontraram associação nos seus grupos controle (Tabela 2) (19, 21). As pacientes com hirsutismo idiopático fazem parte de um grupo intrigante de mulheres hiperandrogênicas nas quais não há elevação nos níveis de androgênios mas sim uma alteração no metabolismo e na ação local destes hormônios (29, 40, 41). O fato destas mulheres apresentarem características metabólicas e hormonais semelhantes à população geral de mulheres e, ao mesmo tempo, referirem a mesma queixa que as pacientes com PCOS (hirsutismo), faz destas mulheres um grupo controle especialmente apto para o estudo da síndrome dos ovários policísticos. (24,28,30,31,32).

Trabalhos anteriores demonstraram associação entre polimorfismos da *CAPN10* e hiperandrogenismo. Escobar e col. (18) avaliaram os polimorfismos UCSNP-45, UCSNP-44 e o UCSNP-43 do gene da calpaína-10 na população espanhola e observaram que pacientes hirsutas homocigotas para o alelo polimórfico A no UCSNP-43 possuem uma maior graduação do hirsutismo, independente da etiologia. Os autores também sugeriram que o alelo C no UCSNP-45 pode estar associado com o diagnóstico de HI (16 pacientes), porém este achado deve ser confirmado em amostras maiores. Gonzales e col. (20) relataram que pacientes hirsutas com PCOS apresentam uma maior frequência da variante polimórfica C no UCSNP-44 quando comparadas a pacientes normais, mas não encontrou relação dos UCSNP-43, UCSNP-19 e UCSNP-63 com características hiperandrogênicas. Nosso trabalho corrobora o estudo de Gonzales pois confirma a idéia de que estas variantes polimórficas não estão associadas com risco de hirsutismo nas pacientes com PCOS. Além disso, os níveis elevados de androgênios encontrados nas pacientes com PCOS estão relacionados com a etiologia do hirsutismo (PCOS *versus* HI), e não com as alterações genéticas.

Embora os estudos populacionais envolvendo o gene da calpaína-10 têm focado principalmente sua relação com diabetes mellitus tipo 2, desfechos secundários como dislipidemia, hipertensão e obesidade também têm sido avaliados. Na população Japonesa, variantes polimórficas nos UCSNP-44 e UCSNP-43 estão relacionadas com dislipidemia, mas não com DM2 (42). Em mulheres com PCOS, a

presença do haplotipo de risco 1121 (UCSNP-44, -43, -19, -63) foi mais frequente nas pacientes dislipidêmicas (colesterol total > 200 mg/dl) (20). Em ambos estudos não há menção quanto a diferenças nos níveis de LDL-c. Nossos resultados demonstram que, nas mulheres com PCOS do sul do Brasil, a presença de variantes polimórficas nos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene da *CAPN10* propiciam um perfil lipídico desfavorável, particularmente elevação do LDL-c. O impacto deste resultado é reforçado pelo fato de quando selecionadas apenas pacientes com sobrepeso e obesas (IMC  $\geq$  25), ajustadas por ICQ, esta associação permanece significativa (dados não - relatados). Isto sugere que a relação destes polimorfismos da CAPN-10 com síndrome metabólica está, na realidade, associada com a presença de PCOS, e não com obesidade ou adiposidade central. Já nas pacientes com HI não encontramos associação entre variáveis metabólicas e variabilidade genômica no gene da *CAPN10*.

Outros estudos têm demonstrado resultados positivos para polimorfismos da *CAPN10* apenas com componentes isolados da síndrome metabólica, como níveis elevados de triglicerídeos e redução da expressão do ácido ribonucleico mensageiro do gene da *CAPN10* no tecido adiposo, sem associação com obesidade (43). Shima e col. (44) relataram associação do alelo deletado polimórfico (2R) no locus UCSNP-19 com maior IMC e hemoglobina A (1c) na população Japonesa. Em nosso estudo, a falência em detectar diferenças significativas na análise isolada das variáveis que compõem a síndrome metabólica pode-se dever à idade das pacientes com PCOS, as quais são mais jovens que as HI. Sabe-se, por exemplo, que mulheres com PCOS podem apresentar HAS nos anos pós-puberais mas a HAS sustentada ocorre mais tardiamente (45, 46).

Uma vez que a insulina age direta e indiretamente na patogênese do hiperandrogenismo na síndrome dos ovários policísticos e a resistência insulínica é a hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da síndrome metabólica, seria relevante encontrar uma conexão genética entre resistência insulínica e PCOS. Todavia, ainda não há um teste clínico prático e acurado para o diagnóstico de resistência insulínica. Nossos resultados, por sua vez, demonstram maior prevalência de variantes polimórficas do gene da *CAPN10* nas pacientes com PCOS e síndrome metabólica. Isto sustenta a idéia de que um diagnóstico sindrômico unindo



características metabólicas e alterações genéticas possa ser mais efetivo na identificação de pacientes com PCOS em maior risco de doença cardiovascular, em detrimento da utilização de variáveis únicas e, neste caso, imprecisas, para o diagnóstico de resistência insulínica.

Concluindo, nossos dados indicam uma associação entre as variantes polimórficas do gene da *CAPN10* nos locus UCSNP-43 e UCSNP19 com níveis elevados de LDL-c e presença de síndrome metabólica nas pacientes com PCOS. Estes resultados sugerem que os polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 podem influenciar o fenótipo metabólico da síndrome dos ovários policísticos.

## Referências

1. **Legro RS, Kinselmann AR, Dodson WC, Dunaif A** 1999 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* 84:165–169
2. **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J** 1999 Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22:141–146
3. **Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A** 1987 Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 65:499–507
4. **Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G** 1992 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* 57:505–513
5. **Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs HS** 2000 Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol* 52:595–600
6. **Patel Y, Lane DM** 1999 Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:1279–1285
7. **Smith LK, Rice KM, Garner CW** 1996 The insulin-induced down-regulation of IRS1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease. *Mol. Cell. Endocrinol* 122:81–92

8. **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** 2000 Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26:163–175
9. **Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST, Tufa J, Viali S, Deka R** 2001 Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association. *Am J Hum Genet* 69:1236–1244
10. **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** 2001 Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 69:544–552
11. **Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, Hanis CL, Hasstedt SJ** 2002 Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87:650–654
12. **Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS** 2002 Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes* 51:1644–1648

13. **Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M** 2002 Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* 51:247–250
14. **Schwarz PEH, Horikawa Y, Vcelak J, Selisko T, Rietzsch H, Bendlova B, Schulze J, Cox NJ** 2001 Genetic variation of CAPN10 affects susceptibility to type 2 diabetes in German and Czech population. *Diabetes* 50 Suppl 2:A232
15. **Sun HX, Zhang KX, Du WN, Shi JX, Jiang ZW, Sun H, Zuo J, Huang W, Chen Z, Shen Y, Yao ZJ, Qiang BQ, Fang FD** 2002 Single nucleotide polymorphisms in CAPN10 gene of Chinese people and its correlation with type 2 diabetes mellitus in Han people of northern China. *Biomed Environ Sci* 15:75–82
16. **Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J** 2003 Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 88:244–247
17. **Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ** 2002 Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1669–1673
18. **Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL** 2002 Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 77:581–587
19. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A** 2002 CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3971–3976
20. **Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Ruiz RL, Favez O, Galan JJ, Herreros JÁ, Real LM, Ruiz A** 2003 Specific CAPN10

Haplotypes Influence the Clinical Profile of Polycystic Ovary Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5529–5536

21. **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** 2002 Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2606–2610

22. **Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Kuttan F, Mauvais-Jarvis P** 1990 Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 70:642–646

23. **Azziz R, Dewailly D, Owerbach D** 1994 Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 78:810–815

24. **Spritzer PM, Oppermann-Lisboa K, Mattiello S, Lhullier F** 2000 Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol* 52:587–594

25. **Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HS** 1985 Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 2:1375–1379

26. **Herter LD, Magalhães JA, Spritzer PM** 1996 Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of Clinical Ultrasound*. 24:243–248

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

28. **Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E** 2001 Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 16:1340–1346
29. **Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM** 2003 Gene expression of type 2 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids* 68:641–649
30. **Spritzer PM, Comim FV, Capp E, D’Avila AM** 2005 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*. 37(2):94–98
31. **Frajndlich R, Spritzer PM** 2005 Association between ovarian volume and serum insulin levels in ovulatory patients with idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 83(5):1561–1564
32. **Comim FV, Spritzer PM** 2004 Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:108–113
33. **Ferriman D, Gallwey JD** 1961 Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 21:1140–1148
34. **Executive Summary of Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)** 2001 *JAMA* 285:2486–2497

35. **Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ** 2000 Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2402–2410
36. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF** 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3):1215
37. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
38. **Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A** 1989 Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38:1165–1174
39. **Ibáñez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB, Zegher F** 2002 Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6):2870–2874
40. **Lobo RA, Goebelsmann U, Horton R** 1983 Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 57:393–397
41. **Serafini P, Lobo RA** 1985 Increased 5 alpha-reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 43: 74–78.
42. **Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T** 2002 Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147–152

43. **Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstrale M** 2004 Variation in the Calpain-10 Gene Is Associated with Elevated Triglyceride Levels and Reduced Adipose Tissue Messenger Ribonucleic Acid Expression in Obese Swedish Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89(7):3601–3605
44. **Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H** 2002 Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2):147–152
45. **Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A** 1992 Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction: evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71:599–606
46. **Glueck CJ, Papanna R, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L** 2003 Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 52:908–915



Tabela 1 Características clínicas, hormonais e metabólicas de pacientes hirsutas com PCOS e HI

	PCOS (n=61)	HI (n=31)	P	P <sup>a</sup>
Idade(anos)	20.62 ± 5.89	27.16 ± 10.61	0.003	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	31.12 ± 8.57	26.67 ± 5.85	0.005	
Cintura (cm)	93.70 ± 21.18	80.94 ± 11.76	0.001	
HAS <sup>b</sup>	14 (23%)	5 (16.7%)	0.59	
Glicemia jejum (mg/dL)	88.16 ± 11.5	87.45 ± 11.84	0.782	
Glicemia 2h (mg/dL)	111.50 ± 30.84	98.53 ± 29.27	0.059	
Insulina Basal (μU/ml) <sup>c</sup>	30.40 (17.15-40.7)	15.5 (7.77-22.50)	< 0.001	0.001
HOMA <sup>c</sup>	6.20 (3.43-8.79)	3.71 (1.51-4.77)	< 0.001	0.001
Colesterol Total (mg/dL)	193.39 ± 46.22	173.31 ± 25.81	0.012	0.23
HDL-c (mg/dL)	50.02 ± 10.96	50.0 ± 7.96	0.99	
LDL-c (mg/dL)	122.98 ± 41.87	105.21 ± 26.21	0.019	0.44
Triglicerídeos (mg/dL) <sup>c</sup>	113.5(70.2-139.7)	83 (56-99.5)	0.015	0.253
LH (IU/L) <sup>c</sup>	5.57 (3.02-9.38)	3.0 (1.74-4.59)	0.001	
Escala Ferriman-Gallwey <sup>c</sup>	14.5 (12-23)	16 (12-22)	0.99	
Testosterona total (ng/mL)	1.04 ± 0.42	0.62 ± 0.20	< 0.001	0.14
SHBG (nmlo/L) <sup>c</sup>	19.1 (12.3-32.32)	31.1 (20.3-45.05)	0.01	
IAL <sup>c</sup>	0.17 (0.09-0.34)	0.07 (0.04-0.09)	< 0.001	0.002

<sup>a</sup>P ajustado para IMC (regressão linear)

<sup>b</sup>HAS = pressão arterial ≥130/≥85 mmHg

Valores expressos como média ± DP , teste T Student ou <sup>c</sup>mediana e intervalo interquartil 25-75, teste Mann-Whitney

Tabela 2 Comparação das frequências genotípicas dos polimorfismos da *CAPN10* nos estudos com PCOS

	Gonzales <i>e col</i> (19)		Haddad <i>e col</i> (21)		Presente estudo	
	PCOS (n=55)	Control (n=93)	PCOS (n=185)	Control (n=585)	PCOS (n= 61)	IH (n=31)
<b>UCSNP- 43</b>						
GG	0.563	0.580	0.584	0.562	0.409	0.516
GA	0.345	0.344	0.371	0.368	0.442	0.419
AA	0.090	0.075	0.045	0.069	0.131	0.032
	<i>P=0.97</i>		<i>P=0.49</i>		<i>P=0.271</i>	
<b>UCSNP-19</b>						
3R3R	0.236	0.161	0.148	0.163	0.065	0.193
3R2R	0.472	0.365	0.521	0.454	0.557	0.419
2R2R	0.290	0.462	0.331	0.383	0.295	0.387
	<i>P=0.1</i>		<i>P=0.49</i>		<i>P=0.126</i>	
<b>UCSNP-63</b>						
CC	0.781	0.817	0.835	0.854	0.557	0.741
CT	0.163	0.161	0.165	0.142	0.163	0.161
TT	0.036	0	0	0.004	0.016	0.032
	<i>P=0.71</i>		<i>P=0.62</i>		<i>P=0.841</i>	

Tabela 3 Influência dos polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene *CAPN10* nas variáveis associadas com síndrome metabólica

Alelos	UCSNP-43				UCSNP-19			
	PCOS		HI		PCOS		HI	
	G	A	G	A	3R	2R	3R	2R
Cromossomos (n)	77	43	44	16	42	70	25	37
Cintura (cm)	91.1±21.3	97.4±20.7	82.9±11.7	75.8±10.9	88.2±20.3	91.1±19.9	87.2±15.4	93.4±19.1
HAS	15 (19.5%)	11 (25.6%)	7 (16.7%)	3 (18.7%)	8 (19%)	18 (25.7%)	2 (8.7%)	8 (21.6%)
Glicemia jejum (mg/dL)	87.9±12.4	88.5±9.8	87±10.8	89.1±14.9	86.9±10.7	87.8±11.3	87.6±10.5	87.4±12.6
Glicemia 2h (mg/dL)	109.5±31	113.9±30.8	97.3±27.4	104.7±34.6	105.3±30.7	105.5±29.1	109.5±33.5	114.9±31.9
Colesterol total (mg/dL)	186.3±41.5	204.2±41.5	168.5±26.9	182.5±19	183.3±42.2	195.3±48.6	165.9±25.8	177.5±24.3
HDL-c (mg/dL)	51.7±11.5	47.1±9.6	49.5±8.1	51.6±7.9	50.7±11.5	49.4±10.9	47.8±8.3	51.6±7.4
LDL-c (mg/dL)	115.3±38.9	136.3±44.5 <sup>a</sup>	100.4±27.1	106.5±30.9	110.1±33.9	128.1±46.0 <sup>b</sup>	101.6±24.3	103.3±30
Triglicerídeos (mg/dl)	106.3 (70-131)	125 (70-121)	78 (53-99.5)	90 (59-121)	98 (70.5-129)	104 (65-142)	76 (53-104)	89 (59-107)

Comparação entre grupos foram realizadas através de One-Way ANOVA

<sup>a</sup> P < 0.001 PCOS alelo A vs todos grupos

<sup>b</sup> P = 0.002 PCOS alelo 2R vs HI ambos alelos

Tabela 4 Variáveis associadas com resistência insulínica e hiperandrogenismo e presença de polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene *CAPN10*

Alelos	UCSNP-43				UCSNP-19			
	PCOS		HI		PCOS		HI	
	G	A	G	A	3R	2R	3R	2R
Cromossomos (n)	77	43	44	16	42	70	25	37
Insulina basal ( $\mu$ U/ml)	28.5 (15.3- 41.8) <sup>a</sup>	30.4 (18.5- 40.9) <sup>a</sup>	13.0 (7.8- 22.4)	17.2 (7.2- 23.1)	23.9 (14.5- 36.8)	28.5 (17.5- 41.6)	17.4 (7.9-21.5)	15.5 (7.0- 23.4)
HOMA	5.3 (3.2-8.8) <sup>a</sup>	6.3 (3.6- 8.8) <sup>a</sup>	2.9(1.5-4.6)	4.1 (1.5-5.2)	4.8 (3.0-7.8)	6.0 (3.6-9.5)	3.7 (1.6-4.34)	3.6 (1.5-5.0)
Escala Ferriman- Gallwey	14 (12-23.5)	16 (12- 22.5)	16 (12.7-22)	15 (11.2-16.7)	16 (13-22)	16 (12-22)	15 (11.5-23.5)	13 (12- 16.5)
LH (IU/L)	6.2 (2.9-11)	4.11 (3.3- 8.5)	2.9 (1.6-4.2) <sup>b</sup>	3.4 (2.5-5.2) <sup>a</sup>	6.9 (2.9-13.3)	5.3 (3.1-8.5)	2.8 (1.6-4.8)	3 (2.4-4.2)
Testosterona total (ngl/mL)	1.03 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.20	0.56 $\pm$ 0.14	0.96 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	1.05 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	0.63 $\pm$ 0.22	0.63 $\pm$ 0.21
IAL	0.15 (0.08- 0.3) <sup>a</sup>	0.18 (0.1- 0.36) <sup>a</sup>	0.06 (0.03- 0.09)	0.06 (0.03- 0.08)	0.15(0.09-0.24)	0.18(0.11-0.34)	0.06(0.04-0.089)	0.07 (0.04- 0.09)

Comparações entre grupos foram realizadas através de One-Way ANOVA.

<sup>a</sup> P < 0.001 vs HI alelo G e A

<sup>b</sup> P < 0.001 vs PCOS alelo G e A

<sup>c</sup> P < 0.001 vs HI alelo 3R e 2R

Tabela 5 Presença de Síndrome Metabólica (SM) e associação com polimorfismos UCSNP-43 e UCSNP-19 do gene *CAPN10*

UCSNP 43	Pacientes hirsutas		PCOS	
	G	A	G	A
SM +	18 (16.2%)	16 (28.1%)	14 (20%)	16 (38.6%)
SM -	93 (83.8%)	41 (71.9%)	57 (80%)	27 (61.4%)
	P=0.103		P=0.049	
UCSNP19	3R	2R	3R	2R
SM+	8 (13.4%)	24 (23.5%)	6 (15.8%)	22 (32.4%)
SM-	52 (86.6%)	78 (76.5%)	32 (84.2%)	46 (67.6%)
	P=0.157		P=0.07	

$\chi^2$  (Pearson) : variante polimórfica vs alelo normal em ambos grupos