

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**RESISTÊNCIA À INSULINA E RISCO CARDIOVASCULAR:
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO NO GENE PAI-1 E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MULHERES COM A
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

ORIENTANDA: Mariana Ferreira Sales

ORIENTADORA: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Natália Ferreira

BELO HORIZONTE – MG

2012

Mariana Ferreira Sales

**RESISTÊNCIA À INSULINA E RISCO CARDIOVASCULAR:
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO NO GENE *PAI-1* E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MULHERES COM A
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Genética.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Natália Ferreira

BELO HORIZONTE - MG

2012

043

Sales, Mariana Ferreira.

Resistência à insulina e risco cardiovascular: associação com polimorfismo no gene PAI-1 e parâmetros bioquímicos em mulheres com síndrome dos ovários policísticos [manuscrito] / Marina Ferreira Sales. – 2012.

105 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Karina Braga Gomes Borges. Co-orientadora: Cláudia Natália Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Resistência à insulina. 3. Molécula vascular de adesão celular solúvel. 4. Inibidor 1 de ativador de plasminogenio. 5. Escala Ferriman-Gallwey. 6. Vitamina D – Teses. 7. Genética – Teses. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Ferreira, Cláudia Natália. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



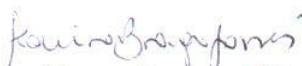
Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570




**"RESISTÊNCIA À INSULINA E RISCO CARDIOVASCULAR:
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO NO GENE PAI-1 E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MULHERES COM A
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS"**


Mariana Ferreira Sales

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Karina Braga Gomes Borges - Orientadora
Farmácia/UFMG


Cláudia Natália Ferreira - Co orientadora
Coltec/UFMG


Rodrigo Bastos Fóscolo
Medicina/UFMG


Zilma Silveira Nogueira Reis
Medicina UFMG

Belo Horizonte. 18 de dezembro de 2012.

*Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se
lhe faltasse uma gota.*

(Madre Teresa de Calcutá)

Dedico esse trabalho aos meus pais, fonte inesgotável de compreensão, apoio e amor. Sem eles a realização desse projeto não seria possível. Essa vitória é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à professora Dra. Karina Braga Gomes Borges, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela compreensão, dedicação, incentivo e disponibilidade. Obrigada também por incitar o desejo pelo conhecimento e pelo raciocínio crítico que tanto contribuíram para meu crescimento profissional.

À professora Dra. Cláudia Natália Ferreira, minha coorientadora, pelo grande auxílio no desenvolvimento prático desse trabalho e por compartilhar comigo seu enorme conhecimento.

À Mirelle de Oliveira Sóter pela grande contribuição fornecida durante desenvolvimento desse projeto. Agradeço também pelo companheirismo e amizade que nasceram no caminhar desse projeto. Desejo-lhe de boa sorte nessa caminhada que ainda continua.

Às médicas do ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UFMG, Dra. Ana Lúcia Cândido e Dra. Flávia Ribeiro de Oliveira pela enorme ajuda no recrutamento de pacientes, esclarecimentos sobre a Síndrome dos Ovários Policísticos e revisão dos trabalhos publicados. Às demais médicas do ambulatório pela ajuda no recrutamento de pacientes.

À professora Ana Paula Salles Moura Fernandes por ceder o laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG para genotipagem inicial das amostras e por contribuir na correção dos trabalhos publicados.

À professora Marinez de Oliveira pela ajuda na divulgação do trabalho para recrutamento de pacientes.

À professora Maria das Graças Carvalho por gentilmente ceder o laboratório de Hematologia para realização das coletas na Faculdade de Farmácia.

Ao professor Adriano Sabino por compartilhar sua experiência me orientando sobre a genotipagem das amostras.

À coordenação do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, na pessoa da Bioquímica Dalva Maria de Resende, por gentilmente realizar alguns dos exames bioquímicos, por ceder o local para as coletas de sangue e, aos funcionários do laboratório, por auxiliarem nas coletas.

À coordenação do Laboratório do Hospital Madre Teresa, na pessoa da Bioquímica Simone Martins Gonçalves, pelo apoio técnico em algumas dosagens bioquímicas.

À equipe do Laboratório São Paulo por gentilmente tornar minha jornada de trabalho flexível, possibilitando a realização desse projeto.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo agradável convívio tornando a execução do projeto mais leve.

Aos meus bons amigos que tanto sentiram minha ausência durante esses dois árduos anos. Agradeço por não deixarem de me apoiar em nenhum momento, sempre me motivando e clareando meu maior objetivo em momentos de turbulência.

Às voluntárias que participaram do projeto que em simplicidade se dispuseram a colaborar.

Aos meus pais Eduardo e Leopoldina. Faltam-me palavras para descrever minha grande e eterna gratidão pela vida, pela educação e pelo apoio incondicional. Ao meu irmão Thúlio pelas brincadeiras, descontração e demonstração de saudade.

À Deus dedico meu sincero agradecimento pela única oportunidade e pela dádiva de ter concluído esse trabalho com êxito.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas.....	X
Lista de abreviaturas.....	XI
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1 - Introdução e justificativa.....	18
2 - Fundamento teórico	
2.1 - Aspectos gerais da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....	22
2.2 - Diagnóstico da SOP.....	23
2.3 - Resistência à insulina e diabetes em mulheres com SOP.....	24
2.4 - Defeito primário neuroendócrino.....	27
2.5 - Produção dos andrógenos ovarianos.....	28
2.6 - Perfil lipídico em mulheres com SOP.....	30
2.7 - O processo inflamatório e moléculas de adesão.....	31
2.8 - A inflamação na SOP.....	33
2.9 - Obesidade e SOP.....	34
2.10 - O inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1).....	36
2.11 - Vitamina D e SOP.....	40
3 - Objetivos.....	42
4 - Capítulo 1.....	44
5 - Capítulo 2.....	67
6 - Conclusões.....	79
7 - Referências bibliográficas.....	81

8 - Anexos

8.1 - Anexo 1 - Ficha clínica.....97

8.2 - Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....100

9 - Adendos

9.1 - Adendo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP.....103

9.2 - Adendo 2 - Carta de submissão artigo 1.....104

9.3 - Adendo 3 - Carta de submissão artigo 2.....105

9.4 - Adendo 4 - Certificado de apresentação do trabalho 1.....106

9.5 - Adendo 5 - Certificado de apresentação do trabalho 2.....107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de andrógenos ovarianos.....	27
Figura 1 (Capítulo 1) - LAP values in PCOS and control group.....	50
Figura 2A (Capítulo 1) - PAI-1 level distribution according to BMI in PCOS women.....	53
Figura 2B (Capítulo 1) - AC x PAI-1 levels.....	53
Figura 3 (Capítulo 1) - PAI-1 level distribution according to 4G/5G polymorphism in PCOS women.....	54
Figura 1 (Capítulo 2) - Scatterplot showing correlation between Ferriman-Gallwey modified score and BMI (A), AC (B) and Insulin (C).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Capítulo 1) - Clinical and biochemical variables comparing PCOS and control groups.....	51
Tabela 2 (Capítulo 1) - Allele and genotype frequency in PCOS and control group for PAI-1 4G/5G polymorphism.....	53
Tabela 3 (Capítulo 1) - Correlation between PAI-1 levels and metabolic/hormonal variables.....	54
Tabela 1 (Capítulo 2) - Clinical and biochemical characteristics of PCOS women.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3 β HSD - 3 β -hidroxesteróide desidrogenase
- 17 β HSD - 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase
- 17OHP - 17-hidroxiprogesterona
- 25OHD - 25-hidroxivitamina D
- AC - *Abdominal circumference*
- AVC - Acidente vascular cerebral
- BMI - *Body mass index*
- CA - Circunferência abdominal
- CCL2 - Quimiocina (motivo C-C) ligante 2
- CCR2 - C-C receptor de quimiocina 2
- CRP- *C reactive protein*
- CYP17 - Enzima citocromo P450 17
- CYP17A1 - Enzima citocromo P450 17 A1
- DHEA - Deidroepiandrosterona
- DM1 - Diabetes mellitus 1
- DM2 - Diabetes mellitus 2
- NOS - Óxido nítrico sintetase endotelial
- F-G - Ferriman-Gallwey
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- HDL-C - Lipoproteína de alta densidade - colesterol
- ICAM-1 - *Intercellular adhesion molecule 1* (Molécula intercelular de adesão)
- ICAM-2 - *Intercellular adhesion molecule 2*
- IGF-I - Fator de crescimento insulínico I
- IGF-II - Fator de crescimento insulínico I
- IGFs - Fatores de crescimento insulínico
- IGFBP-I - Proteína transportadora de IGF-I
- IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IMC - Índice de massa corporal

IRS-1 - Substrato do receptor da insulina-1

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

HNF-4 α - *Hepatocyte nuclear factor 4 α*

HOMA-IR - *Homeostatic model assessment – insulin resistance* (Modelo da Avaliação da Homeostase – resistência à insulina)

LAP - *Lipid accumulation product* (Produto de acumulação lipídica)

LDL-C - Lipoproteína de baixa densidade - colesterol

LH – Hormônio luteinizante

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos

MIF - Fator inibitório de migração de macrófago

MMP - Metaloproteinases de matriz

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NF κ B - Fator de transcrição nuclear κ B

OGTT - *Oral glucose tolerance test* (teste de tolerância oral à glicose)

PA - Ativador do plasminogênio

PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PBMCs - *Peripheral blood mononuclear cells* (células sanguíneas periféricas mononucleares)

PCR allele specific - Reação em Cadeia da Polimerase alelo específica

PCOS - *Polycystic Ovary Syndrome*

PCR - Proteína C reativa

RI - Resistência à insulina

SHBG - Globulina ligadora de hormônios sexuais

sICAM-1 - *Soluble intercellular adhesion molecule 1* (molécula intercelular de adesão solúvel)

SOP - Síndrome dos Ovários Policísticos

sVCAM-1 - *Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (molécula vascular de adesão celular solúvel)

TC - *Total cholesterol* (Colesterol total)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TGF- β - Fator de transformação de crescimento β

TLR4 - Receptor tipo Toll 4

t-PA - Ativador de plasminogênio tipo tecidual

TSH - *Thyroid stimulating hormone* (Hormônio Estimulador da Tireóide)

u-PA - Ativador de plasminogênio tipo uroquinase

VLDL-C - Lipoproteína de baixíssima densidade – colesterol

RESUMO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a endocrinopatia mais comum entre mulheres, afetando entre 4 - 8% deste grupo em idade reprodutiva. O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre fatores metabólicos, hormonais e pró-inflamatórios com o desenvolvimento da SOP em 63 mulheres portadoras da síndrome comparadas com 63 mulheres hígdas (grupo controle). Além disso, foi comparada a frequência do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI- 1 entre 79 mulheres com SOP e 79 mulheres do grupo controle. O grupo de pacientes com SOP apresentou resistência à insulina, níveis aumentados de testosterona e Proteína C Reativa (PCR) e pior perfil antropométrico e lipídico quando comparado ao grupo controle. Os níveis de PAI-1 correlacionaram-se positivamente: com a molécula vascular de adesão celular solúvel (sVCAM-1), com o produto de acumulação lipídica (LAP), índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal, glicemia, com o modelo da avaliação da homeostase (HOMA-IR) e VLDL-C no grupo com SOP. Além disso, encontrou-se uma diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas no polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1 quando comparados os dois grupos, sendo o alelo 4G mais frequente no grupo com SOP. O genótipo 4G/4G mostrou-se associado a níveis mais altos de PAI-1 neste grupo, o qual apresentou ainda uma correlação negativa entre os níveis de vitamina D (25OHD) e sVCAM-1. Uma correlação positiva entre a escala Ferriman-Gallwey (F-G) e IMC, circunferência abdominal e níveis de insulina foi ainda observada no grupo com SOP. Desta forma, medidas de sVCAM-1, 25OHD, PCR e a pesquisa do alelo 4G no gene do PAI-1 podem atuar como bons preditores do estado pró-inflamatório e risco cardiovascular em mulheres com SOP. Os resultados também apontam para o possível uso do LAP como uma ferramenta para avaliação de risco cardiovascular. A escala F-G pode ser um melhor parâmetro que a testosterona para correlacionar hiperandrogenismo e obesidade/resistência à insulina. Por fim, alterações em parâmetros metabólicos e hormonais evidenciam o estado pró-inflamatório e pró-aterogênico em mulheres com SOP.

Palavras-chave: Síndrome dos Ovários Policísticos, sVCAM, vitamina D, PAI-1, PCR, insulina, escala Ferriman-Gallwey.

ABSTRACT

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy among women, affecting 4%-8% of this group in reproductive age. This study aimed to analyze the association among metabolic, hormonal, pro-inflammatory factors and PCOS development in 63 PCOS women compared with 63 healthy women (control group). Furthermore, the frequency of 4G/5G polymorphism in plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene was also compared between a group of 79 PCOS women and a control group with the same subject size. PCOS group presented insulin resistance, increased levels of testosterone and C Reactive Protein (CRP) and worse anthropometric and lipid profile when compared with the control group. PAI-1 levels were positively correlated with soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), lipid accumulation product (LAP), body mass index (BMI), abdominal circumference, glycemia, homeostatic model assessment - insulin resistance (HOMA-IR) e VLDL-C in PCOS group. Besides, a significant difference in allelic and genotypic frequencies in PAI-1 gene 4G/5G polymorphism was found when comparing the groups, with 4G allele showing increased frequency in PCOS group. 4G/4G genotype as associated with increased PAI-1 levels in this group, which also showed a negative correlation between vitamin D (25OHD) and sVCAM-1 levels. A positive correlation between Ferriman-Gallwey (F-G) score and BMI, abdominal circumference and insulin levels was observed in PCOS group. Therefore, sVCAM-1, 25OHD, CRP measurements and 4G allele research in PAI-1 gene might work as good predictors of the low pro-inflammatory state and cardiovascular risk observed in PCOS women. The results also point to a possible use of LAP as a tool to efficiently assess cardiovascular risk in this group. F-G score might be a better parameter than testosterone to correlate hyperandrogenism with obesity/insulin resistance. Finally, alterations in metabolic and hormonal variables evidence the pro-inflammatory and pro-atherogenic state observed in PCOS.

Keywords: Polycystic Ovary Syndrome, sVCAM, vitamin D, PAI-1, CRP, insulin, Ferriman-Gallwey score.

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma desordem caracterizada por hiperandrogenismo, associada à oligo/anovulação crônica e morfologia de ovários policísticos. A doença possui uma etiologia genética, devido ao aumento da frequência da síndrome e de resistência à insulina em mães e irmãs de pacientes com SOP. Entretanto, o modelo de hereditariedade permanece incerto e desconhecido, bem como a interação com vários fatores ambientais, como dieta e estilo de vida.

A síndrome tem prevalência de 4 a 8% das mulheres em idade reprodutiva podendo levar a complicações reprodutivas e obstétricas que incluem disfunção menstrual, infertilidade e complicações na gravidez, associadas à perda gestacional precoce, diabetes gestacional, hipertensão induzida pela gestação e complicações neonatais. As mulheres com SOP também apresentam alterações metabólicas incluindo a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória, intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e aumento do risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A doença também pode estar associada a características psicológicas como depressão, com consequente redução da qualidade de vida.

A SOP é ainda caracterizada por alterações no perfil lipídico, atingindo aproximadamente 70% das mulheres com a síndrome. A obesidade também é uma característica comum nestas pacientes, bem como o hirsutismo e níveis aumentados de andrógenos.

A doença pode estar associada a um estado pró-inflamatório, evidenciado pela elevação sérica de um vasto número de mediadores inflamatórios, como a Proteína C Reativa. Sabe-se que a presença um estado pró-inflamatório crônico está associada ao aumento do risco de complicações metabólicas, o que poderia justificar o aumento desse risco em mulheres com SOP.

O inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), além de ter um papel importante na coagulação sanguínea, também é uma molécula pró-inflamatória que atua através da potencialização da ativação de neutrófilos e da regulação da migração celular. A presença do alelo 4G na região promotora do gene do PAI-1 parece estar associada a um aumento dos níveis desta proteína. Estudos apontam para uma associação da SOP com níveis elevados de PAI-1. No entanto, esta relação ainda não completamente elucidada.

O aumento da expressão gênica de moléculas de adesão tem sido considerado um marcador precoce de aterosclerose e outras complicações cardiovasculares. Níveis aumentados de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) têm sido encontrados em pacientes portadores diabetes mellitus tipo 1 e 2, no entanto, sua relevância no desenvolvimento e complicações da SOP ainda não foi avaliada.

Estudos têm demonstrado ainda uma associação entre a diminuição dos níveis de vitamina D e sintomas da SOP, incluindo resistência à insulina, infertilidade e hirsutismo, embora os resultados ainda sejam controversos.

Existe, portanto, na literatura uma lacuna no que diz respeito à compreensão de como os parâmetros hormonais, metabólicos e inflamatórios se relacionam na SOP e a importância desses fatores no desenvolvimento e complicações na doença.

Desta forma, o presente trabalho objetiva responder a estes questionamentos, com uma maior compreensão da síndrome, com o intuito de auxiliar no futuro na condução de medidas que possam retardar as complicações da doença. Estas respostas serão apresentadas na forma de dois capítulos, onde constam os resultados obtidos neste estudo.

2- FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1- Aspectos gerais da Síndrome dos Ovários Policísticos

A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma desordem multifatorial caracterizada por hiperandrogenismo, associada à oligo/anovulação crônica e morfologia de ovários policísticos. Alterações metabólicas também são encontradas em pacientes com SOP, incluindo a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória, sendo esse quadro o mais importante associado à produção e metabolismo alterados de andrógenos (1). A síndrome está ainda associada a uma grande variedade de alterações reprodutivas, obstétricas, metabólicas e psicológicas. As manifestações reprodutivas e obstétricas podem incluir a disfunção menstrual, infertilidade e complicações na gravidez, associadas à perda gestacional precoce, diabetes gestacional, hipertensão induzida pela gestação e complicações neonatais. As complicações metabólicas incluem o risco elevado de intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), síndrome metabólica e aumento do risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. As mulheres com SOP também podem ter alterações psicológicas como depressão, com consequente redução da qualidade de vida (2).

A SOP apresenta quadro clínico bastante heterogêneo e é a endocrinopatia mais comum nas mulheres em idade fértil com prevalência de 4% a 8% (3, 4). Embora sua fisiopatologia seja desconhecida, parece que a resistência à insulina, o hiperandrogenismo e a alteração na dinâmica das gonadotrofinas são os mais importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos (5).

A heterogeneidade da SOP reflete a participação de múltiplos mecanismos fisiopatológicos. Entretanto, o quanto cada um contribui para gerar a SOP ainda permanece desconhecido (6). Anormalidades bioquímicas foram descritas e parece que o defeito primário é a resistência à insulina (RI) no tecido muscular e adiposo, com hiperinsulinemia compensatória, ainda que os ovários permaneçam sensíveis à insulina. Além disso, é provável que a RI possa estar relacionada a longo prazo com a disfunção intrínseca das células β -pancreática (7, 8).

A SOP possui uma etiologia genética, uma vez que mães e irmãs de pacientes com a síndrome apresentam maior frequência de SOP e RI. Entretanto, os genes envolvidos na síndrome, bem como o modelo de hereditariedade permanecem incertos. A contribuição dos fatores ambientais, como dieta e estilo de vida no desenvolvimento da doença não está ainda clara. (9, 10).

Outra característica importante na SOP é a alteração na dinâmica das gonadotrofinas. Estudos *in vitro* de cultura de células da teca de mulheres com a SOP apontam para maior eficiência nessas células na conversão dos precursores de andrógenos em testosterona do que as células de mulheres sem SOP. A capacidade dessas células em aumentar a produção de andrógenos é intrínseca e, possivelmente, geneticamente determinada (6). Yarak et al. (2005) demonstraram que as células teca de pacientes com SOP apresentavam níveis mais elevados das enzimas 17-hidroxilase e C17,20-liase. A enzima 17-hidroxilase/17,20-liase catalisa duas reações seqüenciais: a 17- α -hidroxilação da pregnenolona e da progesterona, e a clivagem da cadeia lateral 17,20 dos produtos 17-hidroxilados produzindo deidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, respectivamente. A DHEA é o precursor da androstenediona, da testosterona e do estrógeno (e quimicamente similar a estes), sendo então convertida em andrógenos ou estrógenos dependendo do sexo, idade e características individuais. A DHEA é um dos esteróides precursores da testosterona e do estradiol, apesar da sua molécula apresentar fraca ação androgênica. Considera-se que 50% dos hormônios masculinos e 70% dos hormônios femininos são derivados da DHEA (11).

Outros estudos observaram *in vivo* anormalidades das células da granulosa em mulheres com SOP (6, 12, 13). Estas mulheres apresentaram capacidade significativamente aumentada de produção de estradiol em resposta a um estímulo externo de hormônio folículo estimulante (FSH), quando comparadas com mulheres sem a síndrome. Em pacientes com SOP, a produção de estradiol foi transitória, pois após um pico de concentração, houve um declínio acentuado na concentração de estradiol, ao contrário de mulheres híginas que permaneceram com concentrações elevadas por mais de 24 horas (13).

As teorias propostas para explicar a fisiopatologia das alterações das gonadotrofinas são: 1) aumento da produção dos andrógenos ovarianos; 2) defeito na ação e secreção da insulina, ocasionando hiperinsulinemia e RI; 3) defeito primário neuroendócrino, ocasionando aumento da frequência de pulso e amplitude do hormônio luteinizante (LH); e 4) aumento da produção dos andrógenos adrenais (6).

2.2 - Diagnóstico da SOP

Nos últimos 15 anos, os critérios diagnósticos do *National Institute of Child Health & Human Development* (14) foram utilizados com base na presença de anovulação

crônica, hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia associados à exclusão de outras doenças endócrinas com fenótipos semelhantes. Segundo esses critérios, 4% a 8% das mulheres na população geral são portadoras da doença (3).

Em 2003, *American Society for Reproductive Medicine* e *The European Society of Human Reproduction and Embryology* estabeleceram critérios para diagnóstico da SOP que vêm, desde então, sendo adotados (15). Para confirmação do diagnóstico, pelo menos dois dos três critérios devem estar presentes:

- oligovulação ou anovulação;
- hiperandrogenismo (bioquímico ou clínico), excluindo outras doenças relacionadas;
- presença de ovários policísticos visualizados através de ultrassonografia.

A oligovulação é o quadro no qual o sangramento menstrual ocorre em intervalos maiores ou iguais a 35 dias e menores que seis meses. Já a anovulação é a ausência de sangramentos menstruais (16). A hiperandrogenemia clínica é caracterizada pelo hirsutismo, presença de acne e alopecia. Já os indicadores bioquímicos de hiperandrogenismo incluem concentrações aumentadas de testosterona total e androstenediona, além de níveis elevados do índice de andrógenos livres. Os ovários policísticos são caracterizados pela presença de 12 ou mais folículos em ambos os ovários medindo de 2 a 9 mm de diâmetro e/ou volume ovariano aumentado (17).

2.3 - Resistência à insulina e diabetes em mulheres com SOP

Acredita-se que a hiperinsulinemia seja a alteração bioquímica central e, provavelmente, hereditária da SOP. A insulina atua por meio dos receptores de insulina, que estão amplamente distribuídos nos ovários (18, 19), pelos receptores do fator de crescimento insulínico I (IGF-I); ou ainda por receptores híbridos, que contêm combinação das subunidades α e β dos receptores de insulina e IGF-I. Em mulheres com SOP parece haver uma disfunção nos mecanismos de ação da insulina pós-receptores, pois há muitas mulheres obesas e com quadro de resistência à insulina que não desenvolvem a SOP (20, 21).

A insulina desencadeia um notável conjunto de respostas biológicas. Os tecidos-alvos importantes para regulação da homeostasia da glicose pela insulina são fígado, músculo e tecido adiposo; todavia, a insulina também exerce potentes efeitos

reguladores sobre outros tipos de células. Ela é também o principal hormônio responsável pelo controle da captação, utilização e armazenamento de nutrientes celulares. As ações anabólicas da insulina incluem a estimulação da utilização e do armazenamento intracelulares de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, enquanto a mesma inibe processos catabólicos, como a degradação do glicogênio, lipídios e proteínas. A insulina exerce essas funções gerais ao estimular o transporte dos substratos e íons para o interior das células, promover a translocação de proteínas entre os compartimentos celulares, ativar e inativar enzimas específicas, bem como alterando taxas de transcrição gênica e tradução de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) (22).

O receptor de insulina é uma grande glicoproteína transmembrana constituída de duas subunidades α e duas subunidades β , que estão ligadas por pontes dissulfeto, formando um heterodímero β - α - β - α . As subunidades α são completamente extracelulares e contêm o domínio de ligação da insulina, enquanto a subunidades β consistem em proteínas transmembrana que exibem atividade de tirosina proteína-quinase. Após a ligação da insulina, os receptores agregam-se e são rapidamente internalizados. Após a internalização, o receptor pode ser degradado ou reciclado para a superfície celular (22).

O receptor de insulina pertence à família de receptores tirosina-quinase, que inclui o receptor do IGF-I, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento derivado das plaquetas, fator de crescimento estimulante da colônia-I e os vários receptores de citocinas (23, 24). A proteína-quinase que induz a fosforilação da serina no receptor de insulina, inibindo sua ação, também leva à fosforilação no citocromo P450-c17 α , causando RI e hiperandrogenismo, respectivamente. Este fator responsável pela fosforilação da serina é geneticamente determinado, sendo assim, o defeito genético na fosforilação da serina poderia ser a ligação entre a SOP e RI (6).

Aproximadamente 50% das mulheres com SOP possuem um aumento significativo de fosforilação dos resíduos de serina na subunidade β do receptor de insulina presente em fibroblastos de pele, enquanto a fosforilação de tirosina encontra-se reduzida. Pacientes com SOP apresentaram o mesmo padrão de anormalidade na fosforilação em receptores do músculo esquelético (25). O estudo da variabilidade genética em algumas síndromes caracterizadas por RI revelou mutações no gene da insulina associadas ao processo de ligação insulina-receptor e na sua atividade tirosina-

quinase (26). Dentre estas alterações genéticas, o polimorfismo Gly1057Asp no substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) parece interferir nos níveis de glicose em uma população não diabética, afro-americana com SOP (27).

A hiperinsulinemia aumenta a produção de andrógenos nos ovários e dos fatores de crescimento insulínico I e II no fígado (7, 28). O efeito direto da insulina e do IGF-I é o aumento de atividade da 17-hidroxilase nos ovários, causando hiperprodução androgênica, principalmente da androstenediona, da testosterona e de seu precursor, a 17-hidroxiprogesterona (17OHP) (20). O IGF-I inibe a enzima aromatase, impedindo, assim, a conversão da testosterona em estrógenos (29). Indiretamente, a insulina parece potencializar a ação do LH nos ovários (30). Outro efeito da hiperinsulinemia, assim como da obesidade, seria de diminuição da produção hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e de IGFBP-I (proteína transportadora de IGF-I), contribuindo para ação mais ampla da testosterona livre e IGF-I, respectivamente, nas células-alvo (19).

A associação entre excesso de andrógenos na circulação e o diabetes mellitus foi primeiramente observada há aproximadamente 75 anos, mas o mecanismo preciso que sustenta a patogênese da intolerância anormal à glicose não foi ainda estabelecido (30). Mulheres com SOP têm risco acentuadamente aumentado de desenvolver intolerância à glicose e DM2. Acreditava-se, anteriormente, que apenas mulheres obesas apresentavam intolerância à glicose, entretanto, mulheres não obesas também podem apresentar o quadro. A prevalência de intolerância oral à glicose e DM2 encontrada em pacientes com SOP foi substancialmente maior do que aquela encontrada em mulheres hígdas. Estima-se que a intolerância à glicose está presente em 31% a 35% das mulheres com SOP (31, 32) Esta alta prevalência também é observada em adolescentes com a síndrome, com estimativas de 29,6% para intolerância à glicose e 7,4% para DM2 (33). Esses achados contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes com a doença (32).

O *Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance* (HOMA-IR), desenvolvido por Mathews et al. (1985) (34), tem sido amplamente utilizado para estimativa de RI. Seu cálculo baseia-se na multiplicação dos valores plasmáticos da insulina de jejum e da concentração plasmática de glicose de jejum, sendo o resultado dividido por 22,5 (35). Acredita-se que uma elevação nos níveis de HOMA-IR seja o estado inicial de hiperinsulinemia em mulheres portadoras de SOP (36). Sabe-se que a RI é um fator de risco para DM2, hipertensão, disfunção endotelial e doenças cardiovasculares (36),

entretanto a etiologia da RI ainda não foi completamente elucidada nas mulheres com SOP.

2.4 - Defeito primário neuroendócrino

A alteração da função neuroendócrina parece ter também um papel importante na SOP. Mulheres com SOP demonstraram ter níveis aumentados de LH e amplitude aumentada no pulso desse hormônio. Além disso, indícios apontam para uma ligação entre níveis de LH e hiperandrogenemia em mulheres com SOP (37).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é um hormônio formado por dez peptídeos, secretado em forma de pulso por uma rede funcionalmente integrada de neurônios – o pulso gerador de GnRH – localizado no hipotálamo. O GnRH estimula a síntese e secreção do LH e do FSH. Na fase folicular inicial e luteínica, o FSH é predominante sobre o LH, enquanto o LH é predominante sobre o FSH na fase folicular. Ambos são regulados pela frequência do pulso do GnRH, com a síntese e secreção do LH favorecida por pulsos rápidos do primeiro (mais de um pulso por hora) e o FSH favorecido por frequências lentas (menos de um pulso em duas a três horas) (38).

Ao contrário dos padrões de pulso observados em mulheres com ciclo menstrual normal, nas mulheres com SOP a persistência dos pulsos rápidos de GnRH provavelmente tem um papel importante no desenvolvimento inicial da síndrome, uma vez que ocorre o aumento na secreção de LH e há deficiência de FSH. O aumento nos níveis de LH pode levar ao hiperandrogismo ovariano e pode impedir o desenvolvimento folicular. A diminuição relativa de FSH pode também prejudicar o desenvolvimento folicular e acentuar o quadro de hiperandrogenismo via redução da atividade da enzima aromatase nas células granulosas (37).

A desregulação do mecanismo de secreção do GnRH ainda não foi completamente elucidada. Sugere-se, por meio de observações no período peripuberal (adrenarca), que as alterações nas informações do sistema neuronal pela insulina, IGF-I, crescimento insulínico tipo II (IGF-II) e esteróides sexuais poderiam induzir a desregulação do pulso gerador da atividade do GnRH (13,39). A fraca aromatização periférica dos andrógenos a partir da androstenediona e a baixa concentração de estrona são capazes de aumentar a sensibilidade hipofisária ao GnRH, através do aumento da sensibilidade dos receptores de GnRH, contribuindo para a patogênese

da SOP e justificando o aumento nas concentrações de LH e a resposta exagerada de LH ao GnRH (40).

2.5 - Produção dos andrógenos ovarianos

Hiperandrogenismo é o termo utilizado para descrever os sinais clínicos devidos ao aumento da ação biológica dos andrógenos, sendo a hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo bioquímico, o aumento dos andrógenos no sangue. O hiperandrogenismo no sexo feminino ocasiona quadro clínico variável, incluindo puberdade precoce, hirsutismo, acne, seborreia, alopecia, distúrbios menstruais e disfunção ovulatória com infertilidade durante a vida reprodutiva, síndrome metabólica, disfunção psicológica e virilização. A intensidade e extensão dessas manifestações clínicas dependem de vários fatores e não existe correlação estrita entre a intensidade do quadro clínico e as alterações bioquímicas (6).

Várias causas podem levar ao hiperandrogenismo feminino, sendo a SOP considerada a principal causa, representando dois terços das mulheres hiperandrogênicas (6). Os andrógenos são derivados do colesterol e, no sexo feminino, são sintetizados pelos ovários, adrenais e nos locais de conversão extraglandulares dos esteróides (fígado, músculos, pele e tecido adiposo). O colesterol é convertido em pregnenolona, e esta em 17α -OH-pregnenolona pela ação da enzima 17α -hidroxilase ou citocromo P450 17 (CYP17). A 17α -OH-pregnenolona forma a 17OHP e DHEA por ação das enzimas 3β -hidroxisteróide desidrogenase (3β HSD) e $17,20$ liase respectivamente, e este último metabólito, por sua vez, é convertido em androstenediona. Esta se transforma em testosterona ou estrona por meio das enzimas 17β -hidroxisteróide desidrogenase (17β HSD) e aromatase, respectivamente. Por fim, a testosterona é transformada em dihidrotestosterona por ação da enzima 5α -redutase, enquanto a estrona é convertida em estradiol (41).

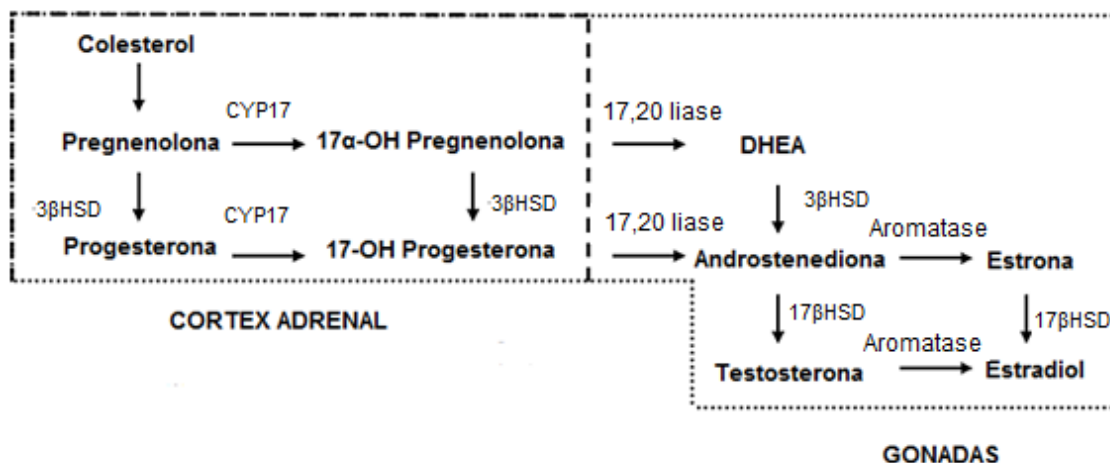


Figura 1: Síntese de andrógenos ovarianos. 3β-hidroxesteróide desidrogenase (3βHSD), citocromo P450 17 (CYP17), 17β-hidroxesteróide desidrogenase (17βHSD).
 FONTE: Heikkilä (2002).

Nos ovários, os andrógenos são precursores da produção de estrógenos, e sua produção está sob o controle do LH e do FSH. A função ovariana normal é determinada pela ação combinada do LH nas células da teca, corpo lúteo e estroma, e do FSH nas células da granulosa (42, 43). O FSH estimula a síntese dos estrógenos nas células da granulosa enquanto as secreções de SHBG e de fatores de crescimento insulínicos (IGFs) por estas células modulam a quantidade de andrógenos formados em resposta ao LH. Além disso, a insulina e os IGFs aumentam a ação do FSH nas células da granulosa (44, 45).

Oitenta por cento da testosterona circulante apresenta-se ligada à SHBG, 19% à albumina, e apenas 1% livre é responsável pelo efeito periférico dos andrógenos. A elevação dos níveis de SHBG está relacionada ao aumento da concentração de estrógenos e hormônios tireoidianos, enquanto os andrógenos, a obesidade, os glicocorticóides, o hormônio do crescimento e insulina inibem sua síntese (43, 46), levando ao aumento de testosterona livre circulante, podendo levar a um quadro de hiperandrogenemia.

Existe forte evidência de que a produção em excesso de andrógenos pelas mulheres com SOP é resultado de uma anormalidade primária na produção de esteróides pelas células da teca ovarianas. Um estudo demonstrou que após uma supressão da síntese e secreção de LH induzida por análogo de GnRH, a produção de 17OHP em pacientes com SOP foi significante maior que em controles, achado que fornece evidências de que existe uma anormalidade intrínseca na esteroidogênese nas células teca de

mulheres com SOP (47). A enzima citocromo P450 17 (CYP17A1), que converte a pregnenolona em 17-OH pregnenolona, é a enzima chave na produção de andrógenos nas células da teca, portanto a produção em excesso de andrógenos em pacientes com SOP parece resultar da desregulação na atividade da enzima devido a um fator ovariano intrínseco (48,49). Entretanto, o polimorfismo no gene da enzima não mostrou associação com suscetibilidade ao desenvolvimento da síndrome (50-53).

Embora a teoria de que a enzima CYP17 tenha sua expressão elevada em pacientes com SOP, estudos ainda não foram desenvolvidos para comparar a expressão do seu gene em células da teca de pacientes com SOP, comparada a de um grupo controle. (46). Li et al. (2012) sugerem que a superexpressão de CYP17 no tecido ovariano pode ocorrer devido à sua indução pela insulina e androstenediona (54).

A unidade pilossebácea e a pele representam as estruturas-alvo dos andrógenos, explicando assim, a fisiopatologia das manifestações cutâneas do hiperandrogenismo (hirsutismo, acne, seborreia e alopecia), sendo o hirsutismo a característica clínica mais frequente do hiperandrogenismo na pele, podendo causar transtornos psicológicos na mulher (3).

Níveis elevados de testosterona total, sulfato de DHEA e androstenediona nos exames laboratoriais são capazes de identificar apenas metade das mulheres com hiperandrogenismo (55). O hirsutismo representa um indicador inicial de hiperandrogenismo clínico (56), e como não há relação estrita entre hiperandrogenismo e alterações laboratoriais (5), a avaliação clínica do hirsutismo pode ser útil em pacientes com SOP. Recentemente, a escala Ferriman-Gallwey (F-G) tem sido utilizada para determinar a severidade do hirsutismo através da estimativa do crescimento capilar em nove sítios anatômicos: lábio superior, queixo, peito, parte superior das costas, parte inferior das costas, abdômen superior, abdômen, braços e coxas (57). Cada área pode ser avaliada individualmente numa escala de 0 a 4, sendo o valor final o somatório de cada parte.

2.6 - Perfil lipídico em mulheres com SOP

Aproximadamente 70% das mulheres portadoras de SOP exibem perfil lipídico alterado. As anormalidades lipídicas presentes são semelhantes às aquelas observadas em pacientes diabéticos que têm níveis elevados de colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triglicérides, e níveis baixos de colesterol

presente na lipoproteína de alta densidade (HDL-C). A hiperglicemia e a hiperandrogenemia associadas à resistência à insulina levam os adipócitos a aumentarem a lipólise com conseqüente liberação de ácidos graxos livres na circulação. Os níveis aumentados de ácidos graxos livres estimulam a secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C), o que leva então a um quadro de hipertrigliceridemia (58, 59). A alteração no perfil lipídico das mulheres com SOP está associada a um elevado risco cardiovascular nessa população (60) em função do aumento da incidência de hipertensão arterial, doença coronariana e trombose (61).

2.7 - O processo inflamatório e moléculas de adesão

A inflamação é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Apesar de suas causas serem muito variadas, os mecanismos de aparecimento da inflamação são comuns. O agente inflamatório age sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores que, ao atingirem os receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício. Os estímulos que levam à liberação de mediadores dessa reação levam também, de modo mais lento, à liberação de mediadores antiinflamatórios, que são responsáveis pela resolução do processo e proteção contra os possíveis efeitos lesivos dos leucócitos e outras células envolvidas no processo. Desse modo, cessada a ação do agente inflamatório, reduz-se a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, passando a predominar os mediadores de regulação. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e, logo depois, surgem os fenômenos de cicatrização ou de regeneração, dependendo da extensão da lesão e do órgão acometido. O processo inflamatório, portanto, é um fenômeno essencialmente dinâmico, razão pela qual seu aspecto morfológico se modifica com o tempo (62).

O recrutamento das células inflamatórias segue os processos de rolamento, ativação e adesão. Esses passos são precedidos por uma captura inicial dos leucócitos do sangue circulante, seguidos por um processo de migração transendotelial, penetração na membrana basal e migração pelo espaço intersticial. A vasta quantidade de receptores, quimiocinas e outros ativadores, além da expressão combinada em diferentes leucócitos e células endoteliais, produz uma grande possibilidade de combinação de processos que selecionam e direcionam os leucócitos para órgãos específicos e para sítios de adesão inflamatória (63).

As selectinas são moléculas essenciais para iniciar o processo de adesão dos leucócitos ao endotélio. Esse processo leva a uma interação contínua entre as selectinas e seus ligantes, os quais se manifestam de maneira rotacional ou em movimento de rolamento. Existe uma forte evidência de que a simples ligação inicial dos leucócitos às selectinas já seria suficiente para induzir sinalizações em vias intracelulares. Essas sinalizações são essenciais para a ocorrência de ações subsequentes nos leucócitos, incluindo adesão e migração para os tecidos. Uma adesão mais firme requer que moléculas de quimiocinas, mediadores lipídicos e outras moléculas pró-inflamatórias sejam apresentados na superfície do endotélio e não simplesmente liberadas na corrente, aonde seriam perdidas. Essas moléculas, em combinação com as selectinas, posteriormente ativam uma segunda classe de moléculas de adesão, as integrinas, que levam as células a uma firme adesão ao endotélio (64). É importante ressaltar que a ativação das integrinas deve ocorrer dentro de segundos ou em intervalos ainda menores (64,65).

A adesão de leucócitos no endotélio vascular é, portanto, uma etapa crítica para o início do processo de inflamação. No início do processo de migração dos leucócitos para o tecido inflamado, enquanto leucócitos transitórios deslocam-se ao longo do endotélio através da ligação à selectina (L e P), uma ligação mais forte ocorre mediante a ligação das células à *intercellular adhesion molecule 1* ou 2 (ICAM-1 e ICAM-2, respectivamente) e à VCAM-1. Em particular, ICAM-1 e ICAM-2 se ligam à subfamília $\beta 2$ de integrinas expressas nos leucócitos e parecem contribuir para o rolamento local das células no endotélio para posterior migração para o foco inflamatório (66). Durante o processo inflamatório, a ativação das $\beta 2$ integrinas leva a uma mudança conformacional em suas estruturas, indo do estado de inatividade e baixa afinidade para o estado de atividade e alta afinidade. Essas mudanças conformacionais podem ser iniciadas via estímulo recebido de receptores de quimiocinas, citocinas ou antígenos, induzindo sinalização intracelular sendo, posteriormente, acentuadas por aglomerados de integrinas que transferem os sinais externos para o citoplasma (67). Uma vez aderidas, as células podem então, deixar a circulação e migrar para o local da inflamação, guiadas pelo processo de quimiotaxia (68).

A VCAM-1 pertence a uma superfamília, juntamente com a ICAM-1, de glicoproteínas de superfície que promovem a adesão e subsequente recrutamento de leucócitos (69). A VCAM-1 está expressa nos monócitos, células endoteliais e em células sinoviais.

Estruturalmente, a VCAM-1 é um membro da família das imunoglobulinas de 110 kDa. Está expressa na forma de glicoproteína com sete domínios extracelulares ou, através de *splicing* alternativo do mRNA, seis ou oito domínios. A forma predominante em humanos é a que contém sete domínios. A molécula está expressa na superfície das células endoteliais ativadas por citocinas e em células do músculo liso e fibroblastos. Nas células endoteliais, sua expressão é induzida pelas citocinas do tipo fator de necrose tumoral - α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e lipopolissacarídeos (70,71).

Elevações na concentração de formas solúveis de algumas moléculas de adesão têm sido consideradas marcadores precoces de aterosclerose. Níveis aumentados de VCAM-1 têm sido encontrados em pacientes portadores diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e DM2. Bluher et al. (2002) observaram que elevações nos níveis de VCAM-1 e ICAM-1 estão associadas à hiperglicemia, e não à hiperinsulinemia. Além disso, níveis elevados de moléculas de adesão têm sido encontrados na hipertensão arterial e parecem ter significância prognóstica na doença cardíaca isquêmica (72).

2.8 - A inflamação na SOP

O processo inflamatório é um evento que se desenvolve em várias doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e doenças intestinais, artrite e osteoporose sendo que a patofisiologia de muitas dessas doenças é comum (73).

A SOP também está associada a um estado pró-inflamatório, evidenciado pela elevação de um vasto número de mediadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) e PAI-1 (24).

A PCR é uma proteína de fase aguda de 115 kDa da família das pentraxinas de ligação a componentes dependentes de cálcio. A PCR se liga à fosfocolina, fosfoetanolamina, superfície de patógenos, cromatina, histonas, fibronectina, pequenas proteínas ribonucleares e polications. As interações da PCR com seus ligantes são importantes para o reconhecimento de danos ao organismo, células apoptóticas e patógenos bacterianos. A PCR, cuja síntese pelo fígado é amplamente regulada pela citocina IL-6, está envolvida em processos pró-inflamatórios, aonde a proteína ativa a via clássica do complemento através da interação com C1q de maneira similar à ligação antígeno-anticorpo. A PCR interage com receptores de

imunoglobulinas para recrutar células fagocitárias e exerce papel na regulação da ação de neutrófilos (74).

A PCR parece também estar envolvida na inibição da ativação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) pela insulina (75). O óxido nítrico participa nos processos de vasodilatação, angiogênese, trombose, homeostase, crescimento e migração das células musculares lisas da parede vascular, além de atenuar a adesão de monócitos, responsáveis pela etapa inicial do processo de aterosclerose (76).

Em uma tentativa de aprimorar a predição do risco cardiovascular, a PCR tem sido estudada como um marcador de inflamação e tem sido utilizada, em múltiplos estudos epidemiológicos, como preditor de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e morte súbita (77, 78) Boulman et al. (2004) observaram que os níveis sanguíneos de PCR estão aumentados em pacientes com SOP, sendo que 36,8% dos resultados acima dos valor de referência, enquanto apenas 9,6% das pacientes controles exibiam alteração nesse parâmetro. Os resultados apontam para o aumento do risco de desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares em mulheres com SOP (79).

A hiperglicemia, condição que pode ser encontrada em mulheres com SOP, também é um estado pró-inflamatório devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio providas de células mononucleares do sangue periférico. Essas espécies reativas de oxigênio podem levar a um quadro de estresse oxidativo que, por sua vez, pode ativar o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B), que induz aterogênese (80-82). Recentemente, foi demonstrado que em mulheres com SOP, a geração de espécies reativas de oxigênio e a ativação do NF κ B estão aumentadas independentemente da obesidade. Além disso, esses parâmetros estão diretamente relacionados aos níveis de andrógenos na circulação (83).

NF κ B regula a transcrição gênica de IL-6, citocina pró-inflamatória, capaz de induzir a expressão endotelial de *soluble intercellular adhesion molecule 1* (sICAM-1) e MCP-1, o qual facilita a migração de polimorfonucleares através do interstício. Além disso, a IL-6 está envolvida na captação de lipídios para dentro de macrófagos em placas ateroscleróticas (84, 85). O subsequente rompimento da placa e a trombose são promovidos pelas metaloproteinases de matriz (MMP) e pelo PAI-1, respectivamente (86).

Mulheres com SOP têm, geralmente, níveis diminuídos de SHBG (87). Sabe-se ainda que a insulina é um inibidor da SHBG, por reduzir a sua produção hepática, resultando em baixas concentrações plasmáticas da mesma. A PCR parece interferir na via de sinalização da insulina, resultando em RI. Entretanto, a correlação negativa entre os níveis de PCR e SHBG parece ser independente da resistência à insulina, sugerindo que outro mecanismo possa existir. A presença de gordura no fígado parece estar associada tanto com a elevação nos níveis de PCR quanto baixos níveis de SHBG, mas não foi encontrada correlação entre as variáveis. Esses fatos sugerem que pode haver uma associação direta entre SHBG e PCR. De fato, um estudo *in vitro* demonstrou que a IL-6, um regulador positivo da PCR, pode reduzir a atividade de ligação do *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF-4 α), um importante fator de transcrição que participa do processo de regulação da expressão de vários genes hepáticos, incluindo a SHBG (88).

2.9 - Obesidade e SOP

A obesidade é uma condição clínica que atinge grande número de pessoas nas sociedades ocidentais. Entre 2009 e 2010, a prevalência de obesidade nos Estados Unidos era de 35,5% entre homens e 35,8% entre mulheres (89). Embora milhões de dólares sejam gastos todos os anos na tentativa de tratar o processo acelerado de aterosclerose, o risco elevado de infarto agudo do miocárdio fatal, hipertensão, resistência à insulina e diabetes mellitus que atinge os obesos, o entendimento da base molecular da condição está longe de ser compreendido. O fato de a obesidade ser uma desordem poligênica com características ambientais e comportamentais, fez com que a pesquisa em obesidade fosse uma das áreas mais complexas de investigação em saúde (90).

A obesidade é uma característica comum em pacientes com SOP, sendo observadas taxas de 38% a 88% de sobrepeso ou obesidade nestas mulheres (91). A obesidade está associada ao hirsutismo e a níveis sanguíneos elevados de testosterona, bem como às taxas aumentadas de infertilidade e distúrbios no ciclo menstrual (92). Entretanto, outros estudos são necessários para fornecer uma maior compreensão da interação entre hiperandrogenismo, resistência à insulina e adiposidade em mulheres com SOP (93).

O IMC é o parâmetro utilizado para o diagnóstico da obesidade. Pacientes com índice de massa corporal (IMC) entre 25 kg/m² e 30 kg/m² são classificados como sobrepeso e pacientes com IMC maior ou igual a 30 kg/m² são classificados como obesos (94).

O risco metabólico associado à obesidade depende da distribuição da adiposidade, sendo a obesidade visceral mais danosa ao organismo, se comparada à obesidade subcutânea. A obesidade é importante no diagnóstico da síndrome metabólica e especialmente o acúmulo de gordura visceral está associado à resistência à insulina e doenças cardiovasculares (95). Por este motivo, a medida da circunferência abdominal tem sido utilizada algumas vezes em substituição ao IMC na avaliação de risco para estas co-morbidades.

A obesidade é caracterizada como um estado de baixo grau de inflamação, que acredita-se ser gerado pelo tecido adiposo (96). A inflamação induzida pela obesidade é diferente da inflamação clássica, caracterizada pelos sinais cardinais de rubor, calor, dor, tumor e perda de função. Além disso, na resposta inflamatória clássica, quando o agente causador da inflamação é removido ou neutralizado, a inflamação é resolvida. Entretanto, a resposta inflamatória observada na obesidade é de natureza crônica (97).

O tecido adiposo produz uma série de hormônios e citocinas, denominadas adipocinas, que têm importante papel no metabolismo de carboidratos e lipídios. Essas substâncias aparentam exercer um importante papel na patogênese da resistência à insulina, diabetes e aterosclerose (98).

O tecido adiposo na obesidade é caracterizado pela infiltração de macrófagos e essas células são importantes para o desenvolvimento da inflamação (99). Um aumento na infiltração de macrófagos pode ser ocasionado por uma série de quimiocinas. Uma das mais importantes é a quimiocina (motivo C-C) ligante 2 (CCL2) e seu receptor cognato C-C receptor de quimiocina 2 (CCR2), ambos contribuindo para a resistência sistêmica à insulina, infiltração de macrófagos e manutenção dos mesmos no tecido adiposo (96, 99).

Além da infiltração de macrófagos, a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator inibitório de migração de macrófago (MIF), TNF- α , interleucina 8 (IL-8), IL-6 e interleucina 1 β (IL-1 β) estão aumentadas no tecido adiposo em obesos (100, 101). Pacientes com SOP têm níveis elevados de IL-6, IL-8, resistina,

leptina e TNF- α quando comparados com um grupo controle. Diminuições significativas nos níveis de omentina-1 (uma adipocina expressa preferencialmente no tecido adiposo visceral que está negativamente associada à resistência à insulina e obesidade) e grelina (hormônio que tem importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético) também foram observadas em mulheres com SOP (102).

Sabe-se que indivíduos obesos têm maior chance de desenvolverem complicações cardiovasculares, sendo eventos ateroscleróticos mais freqüentes neste grupo (103). Uma ferramenta importante que está sendo utilizada para relacionar o risco cardiovascular e a circunferência abdominal (CA) consiste no *Lipid Accumulation Product* (LAP), calculado com base nos valores de CA e triglicérides (104):

$$\text{LAP} = (\text{CA [cm]} - 58) \times (\text{concentração triglicérides [mmol/L]})$$

Altos níveis de LAP estão associados ao DM2 e aumento mortalidade por falência cardíaca em mulheres não obesas sob risco cardiovascular (105). Wiltgen et al. (2009) observaram uma associação entre LAP e o índice HOMA-IR em um estudo de coorte com mulheres portadoras de SOP (106). Uma relação positiva entre LAP e tolerância reduzida à glicose foi também relatada por Wehr et al. (2011) (105).

2.10 - O inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1)

O PAI-1, uma glicoproteína de 50 kDa, é um membro da superfamília dos inibidores das serinoproteases e seu gene está localizado no cromossomo 7, posição q21.3-q22. O gene tem 12.2 kbp e está organizado em 9 éxons e 8 íntrons, e especifica dois tipos de transcritos de aproximadamente 2.3 e 3.2 kb de comprimento, que são colineares em suas extremidades 5' e formados por poliadeniliação alternativa. A estrutura geral da molécula de PAI-1 é semelhante à de outras serinoproteases e parece ser sensível à desnaturação térmica. As primeiras moléculas às quais o PAI-1 se liga são o ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA), o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA), a fibrina, vitronectina e membros da família dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (90).

A ausência de cisteínas e grande quantidade de metioninas podem contribuir para a susceptibilidade da molécula à inativação irreversível por agentes oxidantes. O centro

reativo da inibição do ativador do plasminogênio (PA) (Arg346/Met347) contém uma região exposta de “laço apertado” na extremidade carboxi-terminal que serve como pseudo-substrato para as serino-proteases alvo. A inibição do PA pelo PAI-1 ocorre rapidamente resultando na formação de uma ligação covalente entre as duas moléculas. O inibidor é consumido no processo, ou seja, é um “inibidor suicida” (90).

Embora o PAI-1 esteja presente em baixas concentrações no plasma, a sua relativa meia vida (aproximadamente 10 minutos) sugere alta taxa de biossíntese. Além disso, a sua concentração aumenta rapidamente em resposta a uma grande variedade de agentes ou muda em diferentes estados fisiológicos, indicando que a quantidade de PAI-1 no plasma é sujeita a regulação dinâmica. Apesar disso, a origem do PAI-1 sob condições normais e patológicas permanece indefinida. O fígado parece conter concentração elevada de mRNA de PAI-1. Além disso, o PAI-1 pôde ser identificado no baço, nos rins, no pulmão, na placenta, no útero e no miocárdio. Esses achados devem ser considerados com cautela, uma vez que esses tecidos foram obtidos em condições de estresse (após trauma, em pacientes com saúde comprometida ou após grandes cirurgias) além do fato de a molécula ser uma proteína de fase aguda em humanos (90).

A expressão gênica do PAI-1 *in vitro* e *in vivo* é induzida por endotoxina, TNF- α e fator de transformação de crescimento beta β (TGF- β), e uma variedade de outros fatores de crescimento, citocinas, hormônios e proteinases. A diversidade de reguladores sugere que a região reguladora do gene do PAI-1 deve ser extremamente complexa, contendo sequências de DNA que são direta e indiretamente responsivas a todas essas moléculas (90).

A concentração normal de PAI-1 no plasma humano varia de 6 a 80 ng/mL, com média de 24 ng/mL. Anormalidades na concentração de PAI-1 estão frequentemente associadas a doenças cardiovasculares. O inibidor tem seu nível plasmático aumentado em uma variedade de condições tromboembólicas, incluindo AVC (107) e trombose venosa profunda (108), uma vez que níveis aumentados da molécula podem enfraquecer o sistema fibrinolítico e promover a permanência do coágulo de fibrina. Por outro lado, a ausência da molécula de PAI-1 em humanos leva a problemas de sangramento resultante de um quadro de hiperfibrinólise (109). A neutralização do PAI-1 plasmático com anticorpos específicos aumenta a trombólise espontânea ou mediada pelo t-PA. Essas observações reforçam que o desequilíbrio nos níveis de t-

PA e PAI-1 pode promover tanto trombose quanto sangramento. Esse balanço está severamente prejudicado em pacientes obesos (90).

Conforme já mencionado, a SOP é uma doença que apresenta um estado pró-inflamatório e caracteriza-se pela elevação dos níveis de um vasto número de mediadores pró-inflamatórios, entre eles o PAI-1. Uma vez que níveis elevados de PAI-1 estão associados às anormalidades na coagulação e nas vias fibrinolíticas, disfunção do miocárdio, sepse e lesão aguda nos pulmões, associados com desfechos não favoráveis (110), o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes com SOP pode culminar com maior mortalidade neste grupo (24).

A concentração sanguínea de PAI-1 pode ser influenciada por idade, sexo, obesidade, hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia e polimorfismos genéticos. A inserção ou deleção de um nucleotídeo do tipo guanina na região promotora do gene do PAI-1 foi identificada 675 pares de bases antes do início do transcrito (-675 4G/5G). Indivíduos homocigotos para a deleção 4G/4G têm níveis aumentados de PAI-1, já indivíduos com o genótipo 5G/5G têm níveis diminuídos e indivíduos heterocigotos 4G/5G têm níveis intermediários (90). O alelo 4G parece ter capacidade de ligação apenas a um acentuador de transcrição, enquanto o alelo 5G liga-se tanto ao acentuador quanto ao supressor, resultando em menor taxa de transcrição. O promotor do gene do PAI-1 é responsivo aos níveis de triglicérides, sendo que os níveis mais altos de PAI-1 são encontrados em pacientes com genótipo 4G/4G e hipertrigliceridemia (111).

O adipócito maduro é uma importante fonte de PAI-1 na circulação. Os níveis de PAI-1 estão aumentados nos quadros de obesidade e resistência à insulina, e estão positivamente correlacionados com as características clínicas na síndrome metabólica, sendo também um preditor de risco de DM2 (112). Além disso, o PAI-1 tem propriedades pró-inflamatórias através da potencialização da ativação de neutrófilos mediada por receptores tipo Toll 4 (TLR4) (110). O PAI-1 regula ainda a migração celular através de três vias distintas, mas não mutuamente exclusivas: 1) modulação da degradação da matriz extracelular via regulação dos níveis de plasmina; 2) regulação da adesão celular e 3) modificando a formação, ou manutenção, de gradientes quimioatraentes (113).

O polimorfismo 4G/5G foi associado à suscetibilidade à SOP no estudo desenvolvido por Diamanti-Kandarakis et al. (2004), mas nenhuma associação em outros estudos foi observada (114, 115). No trabalho desenvolvido por Diamanti-Kandarakis et al. (2004)

na população grega, foi demonstrado pela primeira vez que o genótipo homocigoto 4G/4G e o heterocigoto 4G/5G estavam presentes em frequência significativamente maior em mulheres portadoras de SOP quando comparadas com controles. As mulheres que apresentavam o polimorfismo 4G/4G apresentaram níveis maiores de PAI-1 quando comparadas com os outros genótipos, com exceção do grupo controle com genótipo 4G/4G. Nestes grupos, o fenótipo 5G/5G mostrou estar associado a níveis diminuídos de PAI-1 (114).

2.11 - Vitamina D e SOP

A vitamina D3 é obtida da dieta ou sintetizada pelo organismo através da conversão fotoquímica induzida pela luz solar do 7-dihidrocolesterol presente na pele. O 7-dehidrocolesterol passa por uma fotólise sob a luz ultravioleta para formar a vitamina D3. Posteriormente, a vitamina D3 sofre duas hidroxilações sucessivas, a primeira no fígado formando a 25-hidroxivitamina D (25OHD). A segunda hidroxilação é regulada pelo paratormônio e mediada pela 25-hidroxivitamina D3 1 α -hidroxilase e ocorre predominantemente nos rins. Esse segundo passo produz a forma ativa da molécula, a 1,25-dihidroxivitamina D3. A molécula circula ligada à proteína ligadora de vitamina D até alcançar seus tecidos alvos e então se ligar aos receptores de vitamina D para iniciar seu efeito. A deficiência de vitamina D é um quadro comum na maioria dos países, mesmo nos países tropicais com maior incidência solar, sendo que 10 a 60% dos adultos têm valores menores que 20 nG/mL (116). A deficiência da vitamina D tem sido associada a um grande número de efeitos não relacionados ao metabolismo mineral, uma vez que ela é responsável pela homeostasia do cálcio e do fósforo no organismo. Sua deficiência parece aumentar o risco de desenvolvimento de doenças malignas como doenças do cólon, mama, próstata; doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, doenças intestinais inflamatórias, esclerose múltipla, distúrbios metabólicos como síndrome metabólica, diabetes e hipertensão (117-119). Danescu et al. (2009) (120) apontaram para uma diminuição na incidência de DM2 em pacientes com deficiência de vitamina D após correta reposição. A deficiência também parece estar associada à depressão e quadros de dor crônica (116). Entretanto, o mecanismo através do qual a vitamina D exerce seus efeitos benéficos ainda é desconhecido (120).

Estudos têm demonstrado a associação entre os níveis de vitamina D e sintomas da SOP, incluindo resistência à insulina, infertilidade e hirsutismo (121-124). Mahmoudi et al (2009) apontaram que polimorfismos nos receptores da vitamina D possam ter um

importante papel no desenvolvimento da SOP, bem como na resistência à insulina (125). Existem relatos na literatura sobre níveis diminuídos ou mais elevados de vitamina D em mulheres com SOP (126-129). No entanto, outros trabalhos não apontam evidências de que os níveis de vitamina D diferem entre mulheres com e sem a SOP (119, 129).

3 – OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros de risco cardiovascular e resistência à insulina em mulheres com a síndrome dos ovários policísticos (SOP) por meio da frequência do polimorfismo 4G5G no gene do PAI-1, de parâmetros hormonais, metabólicos e inflamatórios.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar, através de um estudo comparativo entre um grupo de mulheres com SOP e um grupo controle, as seguintes variáveis:
 - Frequência do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1
 - Concentração de glicose, HOMA-IR e perfil lipídico
 - Características antropométricas, como: IMC, CA e LAP
 - Níveis plasmáticos de testosterona, insulina e FSH para avaliação de função endócrina
 - Níveis plasmáticos da PCR, sVCAM-1, PAI-1 e 25 OHD como marcadores de processo inflamatório e hemostático
 - Histórico familiar para diabetes e doenças cardiovasculares.
- 2) Avaliar a associação entre o polimorfismo 4G/5G e os níveis de PAI-1, bem como a escala de Ferriman – Gallwey e os parâmetros metabólicos no grupo com SOP
- 3) Relacionar os parâmetros avaliados entre si.

4 - CAPÍTULO 1

**PAI-1, CRP, sVCAM-1, 25OHD, and LAP index as predictors
of insulin resistance and cardiovascular risk in Polycystic
Ovary Syndrome women**

SALES, M.F.^{1,2}; SÓTER, M.O.¹; CANDIDO, A.L.³; FERNANDES, A.P.^{1,2};
OLIVEIRA, F.R.³; SOUSA, M.O.¹; FERREIRA, A.C.S.⁴; FERREIRA, C.N.⁵;
GOMES, K.B.^{1,2}

1 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil.

2 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil.

4 - Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

5 – COLTEC, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy among women, affecting 4%-8% of women of reproductive age. PCOS is associated with insulin resistance, increased cardiovascular risk, and low chronic proinflammatory state.

Objective: We analyzed the association of metabolic, hormonal, and proinflammatory factors with PCOS development in 63 women with PCOS compared to 63 healthy controls. PAI-1 4G/5G polymorphism frequency was also compared between a group of 79 PCOS women and a control group with the same subject size.

Results: The PCOS group showed insulin resistance, worse anthropometric and lipid profiles associated with cardiovascular risk, and increased levels of testosterone and C Reactive Protein (CRP). PAI-1 levels positively correlated with sVACM-1, lipid accumulation product (LAP), body mass index, abdominal circumference, glycemia, homeostatic model assessment, and VLDL-C. 25OHD deficiency was negatively associated with sVCAM-1 levels in the PCOS group. Significant difference in allele and genotypic frequencies were observed between PCOS and control groups, and the 4G/4G genotype in the PCOS group was associated with increased PAI-1 levels.

Discussion: sVCAM-1, 25OHD, CRP measurements and 4G allele research in PAI-1 gene might work as good predictors of the low pro-inflammatory state and cardiovascular risk observed in PCOS women. The results also point to a possible use of LAP as a tool to efficiently assess cardiovascular risk. Alterations in metabolic and hormonal variables evidence the pro-inflammatory and pro-atherogenic state observed in PCOS.

Keywords: Polycystic Ovary Syndrome, sVCAM, 25OH vitamin D, PAI-1, CRP, insulin.

INTRODUCTION

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a heterogenic condition affecting 4% to 8% of women of reproductive age, making it the most common female endocrinopathy and one of the main causes of infertility in these patients ¹. Besides infertility, the disease is also associated with a range of reproductive manifestations ².

Metabolic disorders are found in patients with PCOS, mainly insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, increased risk for glucose intolerance, type 2 diabetes mellitus (DM2), metabolic syndrome, and development of cardiovascular diseases ³. Most PCOS women present alterations in their lipid profile. These abnormalities include high levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), triglycerides, and low levels of high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) ⁴.

Obesity is a common feature of PCOS women of whom 38 to 88% present overweight or obesity ⁵. Obesity is characterized by a chronic proinflammatory state developed by adipokines which are associated with insulin resistance, diabetes, and atherosclerosis ⁶. Therefore PCOS women are under elevated risk to develop these conditions ⁷.

Inflammation in PCOS may also be supported by other findings. First, these patients present increased levels of C-reactive protein (CRP), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and many other inflammatory mediators ⁸⁻¹⁰. Furthermore, 25-hydroxyvitamin D (25OHD) deficiencies, associated to inflammatory states, were found to be more common in PCOS women ¹¹.

Recently, the soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) has been also implicated in PCOS. Elevated sVCAM-1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was detected in young, non-obese women with PCOS, with a significant association with insulin resistance but independent of body mass index (BMI) ¹².

Although heterogeneity in PCOS may reflect the involvement of multiple pathophysiological mechanisms, it is still unknown how they contribute to develop the syndrome. It is possible that PCOS is influenced by various genetic factors due to the high frequency of the syndrome and insulin resistance in mothers and sisters of PCOS

women. However, the heredity model remains uncertain as well as the role of environmental factors like diet and life style¹³.

In this study, we performed a comprehensive analysis of PCOS women in an attempt to correlate changes concerning reproductive hormones and metabolic, inflammatory, and anthropometric factors. Familial history of cardiovascular diseases and diabetes were also considered. We also employed the Lipid Accumulation Product (LAP), a tool only recently introduced in the PCOS study field, in order to provide a standardized mean to evaluate the risk of cardiovascular diseases in these patients.

The present study is unique in analyzing the association of so many factors with PCOS development. Because PAI-1 showed correlation with other parameters within the PCOS group and because 4G/5G polymorphism is known to play a role in Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) plasmatic level¹⁴⁻¹⁶, we also investigated the contribution of this polymorphism frequency to the levels of PAI-1 protein and correlated it with occurrence of PCOS.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The study was approved by the Ethical Research Committee of the *Universidade Federal de Minas Gerais* (UFMG). Informed consent was obtained from all participants after a full explanation of the study.

Subjects

This case-control study included 158 subjects, 79 PCOS and 79 healthy women for the genetic evaluation. From this group, 63 PCOS women and 63 controls (average age = 30.5 ± 5.1 and 28.0 ± 5.6 , respectively, $p=0.04$) were evaluated for the other parameters. PCOS women were recruited at a reference service of PCOS - *Hospital Borges da Costa* at UFMG, Brazil. The control group was matched with case group regarding social/economic status.

Criteria for diagnosis of PCOS followed Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus¹⁷. Complete clinical history was collected from all the study subjects including an interview assessment of the subjects' cardiovascular risk factors and

diabetes. Detailed information about body mass index (BMI), abdominal circumference (AC), family history of cardiovascular diseases, diabetes mellitus, and use of medicines was obtained from each subject.

Exclusion criteria for both groups included smoking, diabetes mellitus, auto-immune diseases, kidney disease, cancer, acute inflammatory disease, congenital adrenal hyperplasia, Cushing Syndrome, androgen secretor tumors, thyroid pathologies, hyperprolactinemic diseases, hypo or hypergonadotrophic hypogonadism, and pregnant subjects. Subjects under treatment with the following medicines were also excluded: steroids, isotretinoin, cyclosporine, antiretroviral, non-steroidal anti-inflammatory, insulin, metformin, and oral contraceptives. Women who presented CRP > 10 mg/L were also excluded.

The homeostatic model assessment 1 – (HOMA-IR) (fasting glycemia x 0.0555 x insulin/22.5) and LAP [(Abdominal circumference -58) x (triglycerides)] were calculated in both groups in order to estimate insulin resistance and cardiovascular risk, respectively. BMI was categorized in three groups: 1) < 25 kg/m²; 2) 25 to 30 kg/m²; 3) > 30 kg/m² and then in two groups: 1) BMI < 25 kg/m² and 2) BMI > 25 kg/m² in order to better understand the contribution of obesity to PCOS complications. Abdominal circumference values were classified into three groups: 1) < 80 cm, 2) 80-88 cm; 3) > 88cm¹⁸.

Sample collection and laboratory determinations

Serum and plasma samples were collected from all subjects (citrate, heparin, and fluoride). The samples were centrifuged at 2,500 rpm for 20 min for plasma and serum separation. Aliquots were stored at -80 °C, except the fluoride which was rapidly used to measure glucose levels.

Subjects' samples were tested for fasting glycemia, sVCAM-1, PAI-1, CRP, and 25OHD levels. Hormone profile testing included insulin, testosterone, and FSH measurements. Lipid profile included evaluation of TC, HDL-C, triglycerides, LDL-C, and VLDL-C.

Prolactin, 17-hydroxyprogesterone (17OHP), and thyroid stimulating hormone (TSH) were evaluated in order to exclude hyperprolactinemic, adrenal, and thyroid disorders, respectively.

Testosterone, follicle stimulating hormone (FSH), prolactin, 17OHP, TSH, glucose, and CRP levels were measured using Vitros (Johnson and Johnson[®]), according to the manufacturer's instructions. Insulin and 25OHD levels were measured using Abbott ARCHITECT[®]. sVCAM-1 and PAI-1 levels were evaluated using the Human sVCAM-1 Platinum ELISA from eBioscience[®]. PAI-1 ELISA was performed using Imubind[®] - America Diagnostics Inc[®], following the manufacturer's instructions. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed only in PCOS group.

Venous blood was collected from all subjects into 5 mL EDTA tubes and submitted to genomic DNA extraction using Biopur Genomic DNA Purification reagent kit (Biometrix[®]). The PAI-1 polymorphism 4G/5G was investigated by PCR allele specific using oligonucleotides as previously described¹⁹. Three controls with different genotypes (4G/4G, 5G/5G, and 4G/5G) were included in each set of analyzed samples in order to evaluate PCR amplification. Samples were then analyzed by silver stained acrylamide gel electrophoresis.

Statistical analyses

To evaluate normal distribution Shapiro-Wilk test was conducted. T-test was applied for parametric variables to compare two groups and ANOVA to compare three groups. Mann-Whitney test was used to compare two groups in non-parametric variables while Kruskal Wallis followed by Bonferroni correction was applied to compare three groups. Spearman correlation was tested in non-parametric variables and Pearson's correlation in parametric variables. Statistical significance was considered for p values lower than 0.05. A forward stepwise multivariate logistic regression analysis was applied to identify the independent factors associated with PCOS among the variables with a p-value <0.2 in a univariate analysis. It was included: BMI, LAP, CA, glycemia, HOMA-IR, insulin, TC, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglycerides, testosterone, CRP, VCAM-1, PAI-1, 25OHD, and PAI-1 genotype Hosmer-Lemeshow Test was applied to evaluate the adequacy of the multivariate model.

RESULTS

PCOS X CONTROLS

We first analyzed the contribution of various reproductive hormones, metabolic, inflammatory, and anthropometric factors in PCOS and control groups.

PCOS patients showed significant alterations regarding hormonal (testosterone), lipid, and carbohydrate (HOMA-IR and insulin) profiles. Moreover, this group presented higher BMI, AC, and LAP when compared to the control group (Table 1).

Table 1: Clinical and biochemical variables comparing PCOS and control groups

Variables	PCOS n = 63	Controls n = 63	p
BMI (kg/m ²)	28.19 (5.58) ^a	23.80 (3.68) ^a	<0.001*
AC (cm)	96.38 (13.35) ^a	76.04 (8.08) ^a	<0.001*
LAP	59.15 (81.19) ^b	15.49 (19.93) ^b	<0.001*
Glycemia (mg/dL)	88.31 (9.76) ^a	85.57 (7.45) ^a	0.704
HOMA-IR	3.50 (2) ^b	1.73 (1) ^b	0.004*
Insulin (mUI/mL)	16.50 (8.58) ^b	8.50 (6.38) ^b	0.002*
TC (mg/dL)	193.06 (34.88) ^a	183.11 (31.33) ^a	0.020*
HDL-C (mg/dL)	44.06 (13.97) ^a	58.54 (12.26) ^a	<0.001*
LDL-C (mg/dL)	118.31 (34.34) ^a	104.50 (26.98) ^a	0.003*
VLDL-C (mg/dL)	26.50 (28) ^b	16.00 (10) ^b	0.001*
Triglycerides (mg/dL)	133.50 (137) ^b	79.50 (47) ^b	0.001*
Testosterone (ng/dL)	49.64 (40.35) ^a	33.53 (14.74) ^a	<0.001*
FSH (mUI/mL)	5.06 (1.40) ^a	5.11 (2.99) ^a	0.563
CRP (mg/L)	2.90 (9.58)	4.00 (2.00)	0.354
PAI-1 (ng/dL)	43.86 (41.57) ^b	36.24 (27.96) ^b	0.621
25OHD nG/mL	25.85 (13.50)	22.85 (29.40)	0.113
sVCAM-1 nG/mL	672.27 (232.37) ^a	825.26 (260.21) ^a	0.089

Body mass index (BMI), abdominal circumference (AC), homeostatic model assessment 1-insulin resistance (HOMA-IR), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), lipid accumulation product (LAP), follicle stimulating hormone (FSH), C reactive protein (CRP), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), 25-hydroxy vitamin D (25OHD), and soluble vascular cellular adhesion molecule 1 (sVCAM-1). ^a = median standard deviation difference calculated with t-test; ^b = median interquartile range difference calculated with Mann-Whitney test. *Significance p < 0.05.

No significant difference was observed when comparing PCOS and control group for the inflammatory factors analyzed herein, even when the analyses were corrected for BMI. sVCAM and 25OHD also did not show significant difference between the groups (Table 1). Although no significant difference in CRP levels was found between PCOS and control group, a significant difference was observed when the levels were categorized in two groups: (1) < 5 mg/L; (2) ≥ 5 mg/L ($p = 0.008$) with increased frequency of higher CRP levels in PCOS women²⁰.

To further investigate the association of familial history of cardiovascular diseases and diabetes with PCOS development, we compared the frequencies of occurrence of these clinical variables in both groups. Higher frequency of familial history of cardiovascular diseases and diabetes was observed in the PCOS group (58% and 66.7% respectively), when compared to control group (42.0% and 33.3%; $p = 0.002$; < 0.001 , respectively).

The comparison of LAP values between PCOS and control group showed no significant difference when this analysis was conducted within a group of patients with BMI < 25 kg/m² (BMI1) ($p = 0.110$). However, a significant difference was observed when LAP was compared between PCOS and control group with BMI > 25 kg/m² (BMI2) ($p = 0.017$) (Figure 1).

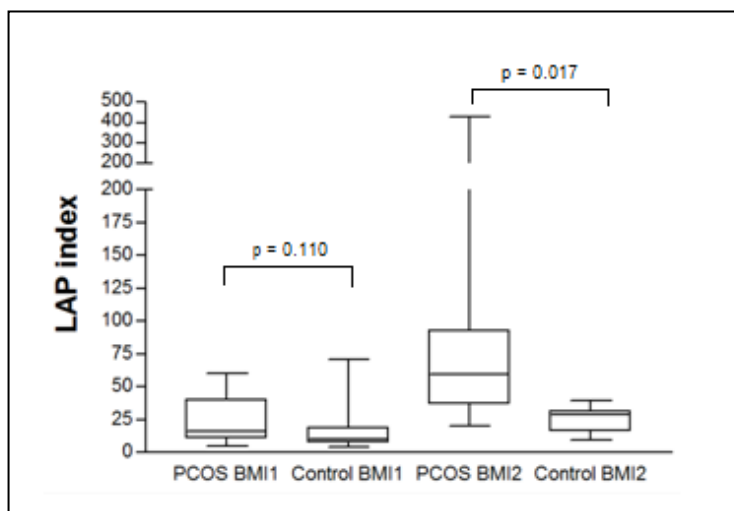


Figure 1: LAP values in PCOS and control group. Lipid accumulation product (LAP), body mass index (BMI), BMI < 25 kg/m² (BMI1), BMI > 25 kg/m² (BMI2).

Median interquartile range difference calculated with Mann-Whitney test. *Significance $p < 0.05$.

A significant difference was observed when comparing the allele ($p = 0.032$) and genotypic ($p = 0.045$) frequencies in PAI-1 gene between PCOS and control group, since PCOS group presented higher 4G allele and 4G/4G genotype frequencies when compared with the control group (Table 2).

Table 2: Allele and genotype frequency in PCOS and control group for PAI-1 4G/5G polymorphism

PAI-1	PCOS	Controls	p
	Allele frequency (N)		0.032*
4G	0.51 (80)	0.38 (61)	
5G	0.49 (78)	0.62 (97)	
	Genotype frequency		0.045*
4G/4G	0.32 (25)	0.20 (16)	
4G/5G	0.38 (30)	0.37 (29)	
5G/5G	0.30 (24)	0.43 (34)	

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). Difference calculated with chi-square test. *Significance $p < 0.05$.

Multivariate logistic regression showed that none of the analyzed variables presented significant and independent association with PCOS ($p > 0.05$ for all variables).

PCOS GROUP

Facing the scarce information regarding the involvement of proinflammatory factors in PCOS, we attempted to correlate these variables among themselves and with metabolic and anthropometric parameters within the PCOS group.

PAI-1 levels showed significant positive correlation with LAP, glycemia, HOMA-IR, OGTT, VLDL-C, triglycerides, and sVCAM-1 (Table 3). A positive correlation with BMI ($p = 0.013$; $r = 0.320$) and AC ($p = 0.006$; $r = 0.364$) was also observed.

Table 3: Correlation between PAI-1 levels and metabolic/hormonal variables

Variables	r	p
LAP	0.372	0.005
Glycemia	0.309	0.050
HOMA-IR	0.503	0.003
OGTT	0.362	0.039
VLDL-C	0.347	0.007
Triglycerides	0.360	0.005
sVCAM-1	0.329	0.010

Lipid accumulation product (LAP), homeostatic model assessment 1-insulin resistance (HOMA-IR), Oral glucose tolerance test (OGTT), very low density lipoprotein (VLDL-C), soluble vascular cellular adhesion molecule 1 (sVCAM-1). Correlation determined by Pearson test. Significant difference $p < 0.05$.

When PCOS women were classified according to BMI groups 1 to 3 (Figure 2A), a significant difference between PAI-1 levels was found between the groups 1 ($< 25 \text{ kg/m}^2$) and 3 ($> 30 \text{ kg/m}^2$) ($p = 0.001$). A significant difference between PAI-1 levels and AC were also found for groups 1 ($< 80 \text{ cm}$) and 3 ($> 88 \text{ cm}$) (Figure 2B; $p = 0.006$).

AS PCOS group showed higher frequency of increased CRP levels, higher BMI and AC measurements when compared with the control group, we aimed to correlate these factors with the other ones analyzed in this study. CRP levels were positively correlated with AC ($p = 0.02$, $r = 0.305$), HOMA-IR ($p = 0.030$, $r = 0.384$) and insulin ($p = 0.001$, $r = 0.573$). When HDL-C was categorized in two groups: 1) HDL-C $< 35 \text{ mg/dL}$, 2) HDL-C $\geq 35 \text{ mg/dL}$, a negative correlation was observed between HDL-C levels and CRP levels ($p = 0.050$, $p = -0.256$). BMI measurements were positively correlated with CRP ($p < 0.001$, $r = 0.444$), AC ($p < 0.001$, $r = 0.880$), HOMA-IR ($p = 0.013$, $r = 0.433$) and insulin ($p = 0.001$, $r = 0.558$). We observed a positive correlation between AC and HOMA-IR ($p = 0.045$, $r = 0.368$) and AC and insulin levels ($p = 0.006$, $r = 0.502$).

We also evaluated the correlation between CRP, BMI and AC with TC, LDL-C, VLDL-C, triglycerides, testosterone and FSH. However, no correlation was observed when these variables were considered ($p > 0.05$).

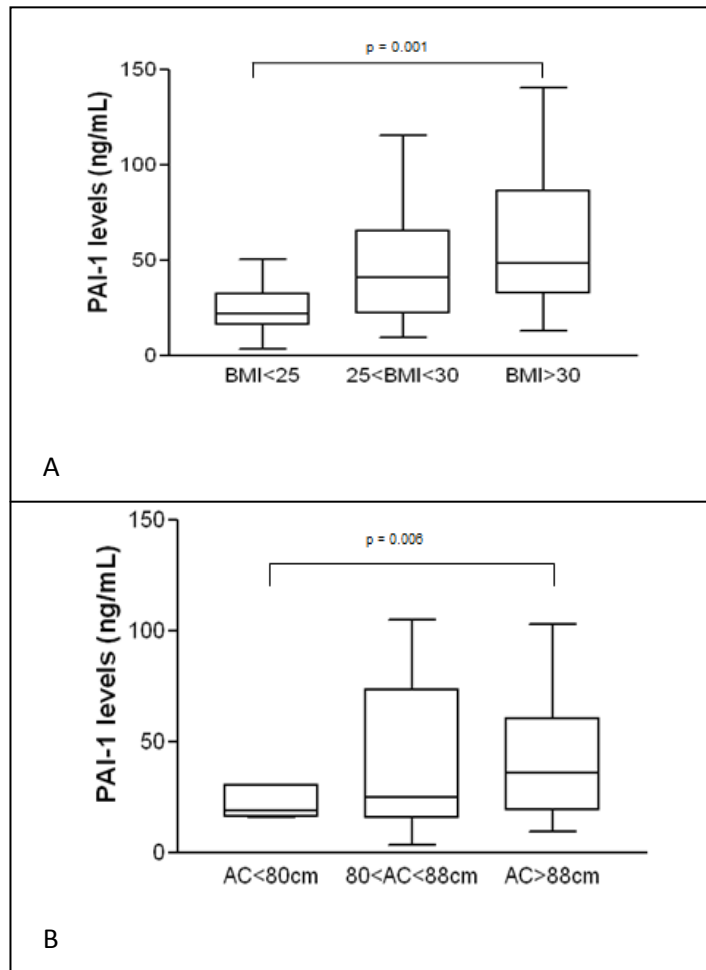


Figure 2: A - PAI-1 level distribution according to BMI in PCOS women. Body mass index (BMI), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). **B - AC x PAI-1 levels.** Abdominal circumference (AC).

Median interquartile range difference calculated with Kruskal-Wallis test. Significant difference $p < 0.05$

A positive correlation was found between LAP and PAI-1 ($r=0.372$, $p=0.005$) and BMI ($r=0.332$, $p=0.012$). A negative correlation was observed between LAP and HDL-C ($r=-0.323$, $p=0.014$). A tendency for a positive correlation was found between LAP and insulin ($r=0.360$, $p=0.060$).

Analysis concerning the relationship between sVCAM-1 levels and the other variables revealed a statistical difference regarding the presence of familial history of cardiovascular diseases (444.32 ± 133.60 for those with no familial history, and 726.70 ± 289.29 for those with familial history, $p = 0.036$). This result was not found when PAI-1 levels were compared with the presence of familial history of cardiovascular diseases ($p = 0.196$).

No statistical correlation between 25OHD and sVCAM-1 levels was observed ($p = 0.438$). However, when 25OHD levels were classified in two groups: (1) < 30 nG/mL; (2) > 30 nG/mL²¹, a significant difference was demonstrated with higher sVCAM-1 levels in patients from group 1 (799.44 ± 363.89 for patients in group 1, and 627.41 ± 186.87 for patients in group 2; $p = 0.020$). No association was found when the same analysis was applied for PAI-1 levels ($p = 0.774$).

Given the importance of PAI-I 4G/5G polymorphism in the control of PAI-I gene expression, we next evaluated the genotype contribution to the levels of PAI-1 in PCOS women.

Significant difference in PAI-1 levels was found between 4G/4G and 5G/5G genotypes ($p = 0.040$) and higher PAI-1 levels were observed in 4G/4G group (Figure 3). Significant difference was not observed when 4G/4G - 4G/5G and 4G/5G - 5G/5G groups were compared.

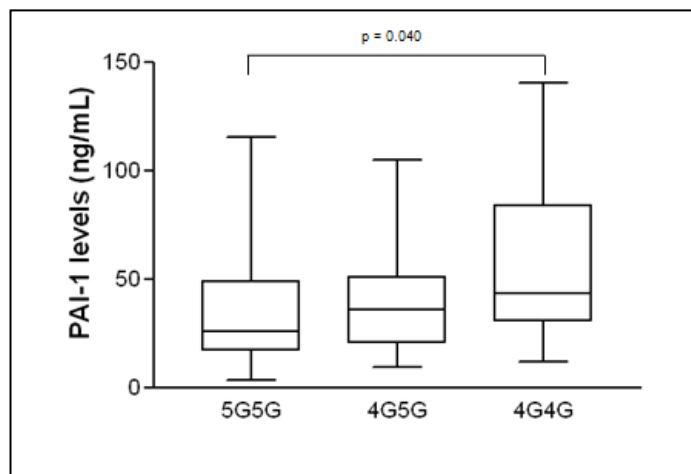


Figure 3: PAI-1 level distribution according to 4G/5G polymorphism in PCOS women - Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)

Median interquartile range difference calculated with Kruskal-Wallis test. Significant difference $p < 0.05$

DISCUSSION

In this study, we searched for a correlation among an extensive list of factors comprising reproductive hormones, as well as metabolic and inflammatory variables in

an attempt to reveal their contribution to PCOS disease development. Moreover, we genotyped 4G/5G polymorphism to correlate with the PAI-1 levels found in the PCOS group and investigated the allele and genotype frequencies in PCOS and control group.

We found higher insulin levels in the PCOS women when compared with the control group. Although glucose levels were not significantly different between them, increased HOMA-IR rates were observed in PCOS women. Taken together these data suggest the presence of higher frequency of insulin resistance in this group. Several studies have documented that fasting serum glucose levels may be normal in women with PCOS, despite the presence of impaired glucose tolerance or DM2²². A higher HOMA-IR rate is thought to be the initial state of hyperinsulinemia amongst PCOS women²³. It is known that insulin resistance is a risk factor for diabetes, hypertension, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. The etiology of insulin resistance in PCOS is not completely understood. Some molecular mechanisms have been suggested to explain the origin of insulin resistance in PCOS including decreased content of GLUT4 glucose transporter and excessive phosphorylation of insulin receptor on serine residues²⁴.

Hormone analysis revealed a significant increase in the levels of testosterone in PCOS women when compared with controls. This finding confirms the hyperandrogenic state frequently observed in PCOS. Indeed, it is estimated that 60% to 80% of women with PCOS have elevated circulating androgen levels²⁵. Studies performed both *in vivo* and *in vitro* (in cultured human theca cells) indicate that ovarian theca cells in PCOS women are more efficient at converting androgenic precursors to testosterone²⁶. We did not observe any difference between the two groups concerning FSH levels. In fact, the literature is controversial about the levels of FSH in PCOS women²⁷⁻²⁹.

Considering the lipid profile analysis, our results showed higher plasmatic levels of TC, LDL-C, VLDL-C, and triglycerides in PCOS when compared with control group. On the other hand, decreased levels of HDL-C were observed in the PCOS group. This condition indicates a complete disturbance in PCOS lipid profile in these patients. Approximately 70% of PCOS women exhibit an abnormal serum lipid profile³⁰. Both insulin resistance and hyperandrogenemia have been shown to contribute to this atherogenic lipid profile in PCOS. High testosterone levels decrease lipoprotein lipase activity in abdominal fat cells, and insulin resistance impairs the ability of insulin to exert its antilipolytic effects. Although these abnormalities would be expected to

increase the morbidity and mortality from coronary artery disease and other vascular disorders in women with PCOS, this frequency has not yet been established ³¹.

BMI measurements were significantly increased in PCOS patients when compared to control group, indicating that these women present a proinflammatory condition and are under greater cardiovascular risk. This suggestion is corroborated by the correlation between BMI and CRP in the PCOS group observed in this study. Although obesity itself is not considered the inciting event in the development of the syndrome, excess adiposity can exacerbate the reproductive and metabolic complications ³². Excess body fat affects blood pressure, lipid profile, and platelet activation. Furthermore obesity contributes substantially to the increased prevalence of insulin resistance, impaired glucose tolerance, and DM2 in PCOS women ³³. In fact, we observed a positive correlation between BMI and insulin levels and HOMA-IR ratio when these variables were evaluated in the PCOS group. Oh et al. (2010) ³³ showed that obesity might also contribute to ovarian hyperandrogenism due to low-grade chronic inflammation through secretion of adipokines such as leptin that exert direct effects on the ovary.

Obesity is particularly associated with visceral adiposity that is reflected by an elevated AC commonly seen in PCOS patients ³⁴. We found considerably higher measurements of AC in PCOS women when compared with controls. Moreover, the PCOS group presented a positive correlation between AC and metabolic factors and between AC and proinflammatory factors such as insulin, HOMA-IR ratio, and CRP. Thus, our data adds support to previous reports indicating that abdominal adiposity may be associated to insulin resistance and glucose intolerance ^{35, 36}. It is thought that these complications are due to the increase of free fatty acids and other adipocyte-derived factors which affect insulin sensitivity in liver and muscle tissues ³⁷. Cytokines such as tumor necrosis factor and interleukin-6 are produced by macrophages as well as by adipocytes and act directly on the liver, inducing the production of acute phase proteins such as CRP. These cytokines also induce suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), impairing insulin signaling. SOCS-3 levels are elevated in obesity and represent a final common pathway of obesity-associated resistance to insulin ³⁸.

We observed a significant difference in LAP in the PCOS group when compared to controls. However this difference was only observed in women with BMI > 25 kg/m². Moreover, when this variable was analyzed in the PCOS group a positive correlation was found with VLDL-C, PAI-1 and a negative correlation with HDL-C. These data suggest that LAP index is associated with an unfavorable lipid profile and

proinflammatory condition mainly in overweight or obese women with PCOS. Although no significant difference between LAP index and glucose metabolism was found, we observed a tendency toward a positive correlation between LAP and insulin levels indicating that this parameter might be associated with insulin resistance in this group. Wiltgen et al. (2009)³⁹ showed that the LAP index is highly correlated with HOMA-IR index in PCOS patients. The National Health and Nutrition Examination Survey population in the USA involving 9,180 subjects⁴⁰ concluded that LAP performed better than BMI for identifying adults at cardiovascular risk. Hence, LAP is probably a better predictor of the incidence of cardiovascular diseases³⁵. Thus, LAP index should be employed by health professionals as an efficient tool to precociously screen PCOS women who are under greater risk to develop insulin resistance-related comorbidities, including cardiovascular disease.

CRP levels were not significantly different between PCOS and control group. Nevertheless, when CRP levels were correlated with other variables in the PCOS group, a positive correlation was observed with HOMA-IR and insulin levels. These findings indicate that CRP might be involved with insulin resistance. Besides, HDL-C levels presented a negative correlation with CRP. It is known that PCOS women may have an increase in subclinical atherosclerotic disease, as suggested by greater carotid intima-media thickness and higher levels of coronary calcifications⁴¹.

Regarding PAI-1 analysis, we did not find any significant difference in PAI-1 levels between PCOS patients and controls. However, when comparing PAI-1 with other parameters in the PCOS group a positive correlation was identified with glycemia, HOMA-IR, OGTT, VLDL-C, and triglycerides. The present study was the first in which a positive correlation between PAI-1 and sVCAM-1 was observed. These findings suggest that increases in PAI-1 levels are associated with insulin resistance, lipid profile alterations, and a proinflammatory condition in PCOS. Evidence supports the view that insulin plays a role in the elevation of PAI-1, as hyperinsulinemic DM2 patients often display reduced fibrinolysis. Furthermore, increased levels of both triglycerides and free fatty acids are associated with obesity and insulin resistance, and stimulate PAI-1 expression in adipocytes³⁷.

PAI-1 levels in PCOS women positively correlated with BMI. When PCOS women were classified in BMI groups 1 to 3, a significant difference between PAI-1 levels was found with groups 1 and 3. These data suggest that PCOS obese women present higher levels of the PAI-1 when compared with lean PCOS patients. AC obeys the same

pattern when analyzed in the PCOS group, indicating that abdominal fat may affect PAI-1 level in this group. The knowledge that obesity directly contributes to adipose PAI-1 expression has recently gained considerable attention. In addition, clinical studies have demonstrated that weight loss due to surgical treatment, diet, etc., significantly reduced plasma PAI-1 levels in obese humans⁴².

The main PAI-1 polymorphism is a common single pair insertion (5G) / deletion (4G) polymorphism, 675 bp upstream from the start of transcription of PAI-1 gene. It has been shown that the variant 4G is associated with higher plasmatic PAI-1 levels¹⁴⁻¹⁶. Thus, we genotyped 4G/5G polymorphism to investigate the allele and genotype frequencies in PCOS and control group and to correlate with the PAI-1 levels found in the PCOS group. A significant difference was found comparing allele and genotype frequencies between PCOS and control group. Moreover, PCOS women with 4G/4G genotype had higher PAI-1 levels than those with 5G/5G genotype. This finding suggests that 4G/4G PCOS women have increased cardiovascular risk and increased thrombogenic tendency. In fact, some studies have demonstrated that 4G allele is involved in increased cardiovascular risk⁴³⁻⁴⁵.

We found a correlation between sVCAM-1 and familial history of cardiovascular disease. Although the role of heredity in PCOS remains unclear, these data suggest those PCOS women who present this history might have increased risk to develop atherosclerotic events initiated by endothelial activation. We did not observe any difference when evaluating plasmatic sVCAM-1 levels between PCOS and controls. This finding is different from that reported by Seow et al. (2012)¹² who found increased sVCAM-1 gene expression in PBMC cell from PCOS. Future studies to further understand the involvement of sVCAM-1 with hyperglycemia, dyslipidemia, insulin resistance, and endothelial function in PCOS women will be enlightening.

Many studies have reported an association between deficiency of 25OHD levels and insulin resistance, ovulatory and menstrual irregularities, lower pregnancy success, hirsutism, hyperandrogenism, metabolic syndrome features, and obesity^{11, 46-48}. Association between 25OHD and oxidative stress, inflammation, and endothelial activation is well known^{49, 50}. In turn, these events lead to an increase in sVCAM-1 release⁵¹. In this study we found, for the first time, a negative correlation between 25OHD and sVCAM-1 levels in PCOS, suggesting that higher 25OHD levels present an anti-inflammatory effect in PCOS women.

The present study did not observe any significant and independent association between PCOS development and the variables BMI, LAP, AC, glycemia, HOMA-IR, insulin, TC, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglycerides, testosterone, CRP, VCAM-1, PAI-1, 25OHD, and PAI-1 genotype in a multivariate logistic regression. This finding corroborates the fact that PCOS is a complex disease in which both metabolic and hormonal alterations concur for the disease phenotype, although the exact mechanism explaining its development remains unclear¹.

A sample of 158 healthy or PCOS women was analyzed in the present study and is therefore, to our knowledge, the largest sample studied so far regarding these variables. Still, further research involving more subjects should be conducted to confirm these results and search for possible correlations between factors which were not observable under the current sample size.

Taken together, our results suggest that increased insulin resistance and inflammatory processes could be associated with cardiovascular disorders in PCOS. We also add evidence to support that analysis of LAP index may be a useful tool to help health workers to evaluate these risks. Further, our study expands the current knowledge about the metabolic, hormonal, and inflammatory complications in PCOS in which PAI-1, CRP, sVCAM-1, and 25OHD seem to be good biomarkers to evaluate the disease prognosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) and FAPEMIG (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais*) for the financial support. Simone Martins Gonçalves and Dalva Maria de Resende for technical support.

REFERENCES

1. Azziz R., Woods K.S., Reyna R. *et al.* (2004) The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metabol.*, **89**, 2745-2749.
2. Pasquali R., Stener-Victorin E., Yildiz B.O. *et al.* (2011) PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and Tomorrow. *Clin Endocrinol.*, **74** (4), 424-433.

3. Lo J.C., Feigenbaum S.L., Yang J. *et al.* (2006) Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, **91** (4), 1357–1363.
4. Xiang S.K., Hua F. & Tang Y. *et al.* (2012) Relationship between serum lipoprotein ratios and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.*, 2012: 173281.
5. Moran C., Arriaga M., Rodriguez G. *et al.* (2012) Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.*, 2012: 31724.
6. Jacobi D., Stanya K.J. & Lee C.H. (2012) Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte*, **1** (1), 4–12.
7. Randeve H.S., Tan B.K., Weickert M.O. *et al.* (2012) Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.*, **33** (5), 812-41.
8. Hu W., Qiao J., Yang Y. *et al.* (2011) Elevated C-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, **157** (1), 53-56.
9. Escobar-Morreale H.F., Luque-Ramírez M. & González F. (2011) Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.*, **95** (3), 1048–58.
10. Mannerås-Holm L., Baghaei F., Holm G. *et al.* (2011) Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, **96** (4), 1068-76.
11. Thomson R.L., Spedding S. & Buckley J.D. (2012) Vitamin D in the etiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).*, **77** (3), 343-50.
12. Seow K.M., Juan C.C., Wang P.H. *et al.* (2012) Expression levels of vascular cell adhesion molecule-1 in young and nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest.*, **73** (3), 236-41.

13. Teede H., Deeks A. & Moran L (2010) Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine.*, **8**, 41.
14. Diamanti-Kandarakis E., Palioniko G., Alexandraki K. *et al.* (2004) The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol.*, **150** (6),793-8.
15. Simoni M., Tempfer C.B., Destenaves B. *et al.* (2008) Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Human Reprod Update.*, **14** (5), 459-84.
16. Fernandes K.S. & Sandrim V.C. (2012) 4G/5G polymorphism modulates PAI-1 circulating levels in obese women. *Mol Cell Biochem.*, **364** (1-2), 299-301.
17. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.*, **19** (1), 41-7.
18. Grundy S.M., Chair M., Cleeman J.I. *et al.* (2005) Diagnosis and management of the Metabolic Syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.*, **112**, 285-90.
19. Mansfield M.W., Stickland M.H. & Grant P.J. (1995) Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promotor polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thromb Haemost.*, **74** (4), 1032-4.
20. Boulman N., Levy Y., Leiba R. *et al.* (2004) Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, **89** (5), 2160-5.
21. Holick M.F. (2007) Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med.*, **357** (3), 266-81.
22. Sharma S.T. & Nestler J.E. (2006) Prevention of diabetes and cardiovascular disease in women with PCOS: Treatment with insulin sensitizers. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, **20** (2), 245-60.

23. Karaer A., Cavkaytar S., Mert I. *et al.* (2010) Cardiovascular risk factors in polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol.*, **30** (4), 387-92.
24. Salehi M., Bravo-Vera R., Sheikh A. *et al.* (2004) Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: what is the role of obesity? *Metabolism.*, **53** (3), 358-76.
25. Azziz R., Carmina E., Dewailly D. *et al.* (2006) Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.*, **91** (11), 4237-45.
26. Hong Y., Gagnon J., Rice T. *et al.* (2001) Familial resemblance for free androgens and androgen glucuronides in sedentary black and white individuals: the HERITAGE Family Study. Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics. *J Endocrinol.*, **170** (2), 485-92.
27. McCartney C.R., Eagleson C.A. & Marshall J.C. (2002) Regulation of Gonadotropin Secretion: Implications for Polycystic Ovary Syndrome. *Semin Reprod Med.*, **20** (4), 317-26.
28. Guzel A.I., Kuyumcuoğlu U. & Celik Y. (2012) Factors affecting the degree of hirsutism in patients with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.*, **285** (3), 767-70.
29. Tang X.H., Cao Y.L., Yang Z.X. *et al.* (2012) Reproductive traits of polycystic ovary syndrome in female rhesus monkeys. *Dongwuxue Yanjiu.*, **33**(1), 37-42.
30. Alexander C.J., Tangchitnob E.P. & Lepor N.E. (2009) Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Cardiovasc Med.*, **10** (2), 83-90.
31. Ehrmann D.A. (2005) Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.*, **352** (12), 1223-36.
32. Randevara H.S., Tan B.K., Weickert M.O. *et al.* (2012) Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.*, **33** (5), 812-41.
33. Oh J.Y., Sung Y.A., Lee H.J. *et al.* (2010) Optimal waist circumference for prediction of metabolic syndrome in young korean women with polycystic ovary syndrome. *Obesity (Silver Spring).*, **18** (3), 593-7.

34. Lindholm A., Blomquist C., Bixo M. *et al.* (2011) No difference in markers of adipose tissue inflammation between overweight women with polycystic ovary syndrome and weight-matched controls. *Hum Reprod.*, **26** (6), 1478–1485.
35. Wehr E., Gruber H.J., Giuliani A. *et al.* (2011) The lipid accumulation product is associated with impaired glucose tolerance in PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab.*, **96** (6), E986-90.
36. Wongwananuruk T., Rattanachaiyanont M., Indhavivadhana S. *et al.* (2012) Prevalence and clinical predictors of insulin resistance in reproductive-aged Thai women with polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.*, 2012: 529184.
37. Wilcox G. (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.*, **26** (2), 19-39.
38. Lazar M.A. (2005) How Obesity Causes Diabetes: Not a Tall Tale. *Science.*, **307** (5708), 373-5.
39. Wiltgen D., Benedetto I.G., Mastella L.S. *et al.* (2009) Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.*, **24** (7), 1726-31.
40. Kahn H.S. (2005) The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord.*, **5**:26.
41. Christian R.C., Dumesic D.A., Behrenbeck T. *et al.* (2003) Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, **88** (6), 2562-8.
42. Loskutoff D.J. & Samad F. (1998) The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **18** (1), 1-6.
43. Mikkelsen J., Perola M., Wartiovaara U. *et al.* (2000) Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism, coronary thrombosis, and myocardial infarction in middle-aged Finnish men who died suddenly. *Thromb Haemost.*, **84** (1), 78-82.

44. Sartori M.T., Vettor R., De Pergola G. *et al.* (2001) Role of the 4G/5G polymorphism of Pal-1 gene promoter on Pal-1 levels in obese patients: influence of fat distribution and insulin-resistance. *Thromb Haemost.*, **86** (5), 1161-9.
45. Al-Hamodi Z.H., Saif-Ali R., Ismail I.S. *et al.* (2012) Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with metabolic syndrome parameters in Malaysian subjects. *J Clin Biochem Nutr.*, **50** (3), 184-189.
46. Hahn S., Haselhorst U., Tan S. *et al.* (2006) Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, **114** (10), 577-83.
47. Wehr E., Pilz S., Schweighofer N. *et al.* (2009) Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.*, **161**(4), 575-82.
48. Yildizhan R., Kurdoglu M., Adali E. *et al.* (2009) Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.*, **280** (4), 559-63.
49. Stach K., Kälsch A.I., Nguyen X.D. (2011) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ attenuates platelet activation and the expression of VCAM-1 and MT1-MMP in human endothelial cells. *Cardiology.*, **118** (2), 107-15.
50. Kudo K., Hasegawa S., Suzuki Y. *et al.* (2012) 1 α , 25 -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **132** (3-5), 290-294.
51. Cook-Mills J.M., Marchese M.E. & Abdala-Valencia H. (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal.*, **15** (6), 1607-38.

5 - CAPÍTULO 2

Ferriman – Gallwey score correlates with obesity and insulin levels in women with Polycystic Ovary Syndrome

SALES, M.F.^{1,2}; SÓTER, M.O.¹; CANDIDO, A.L.³; REIS, F.M.³; SOUSA, M.O.¹;
FERNANDES, A.P.¹; FERREIRA, C.N.⁴; GOMES, K.B.^{1,2}

1 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

4 – COLTEC, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is commonly associated with hyperandrogenism. Hyperandrogenism in women leads to several clinical features such as hirsutism and metabolic syndrome and, consequently, increased risk for cardiovascular diseases. This study aimed to evaluate the correlation between clinical hyperandrogenism assessed by modified Ferriman-Gallwey (F-G) score and metabolic parameters in PCOS women. Fifty PCOS subjects were included. Detailed information about body mass index (BMI) and abdominal circumference (AC) were obtained from each subject. (F-G) score was applied to assess hirsutism through visual method. Insulin, glucose and testosterone were measured. A positive correlation was observed between F-G score with BMI, AC and insulin. No correlation between testosterone and F-G score was found. Obesity, mainly abdominal adipose tissue, and insulin resistance correlate with hyperandrogenism in PCOS women, analyzed by F-G score. F-G score could be a better than testosterone measurement to evaluate hyperandrogenism and cardiovascular risk in PCOS women.

Keywords: Polycystic Ovary Syndrome, Ferriman-Gallwey score, hirsutism, insulin, obesity.

INTRODUCTION

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a heterogenic condition that affects four to eight percent of women in reproductive age. It is the most common endocrinopathy and one of the main causes of infertility in this group (1). PCOS is characterized by the presence of chronic oligo or anovulation and polycystic ovary morphology. Besides infertility, the disease is also associated with other obstetric manifestations and hyperandrogenism (2).

The hyperandrogenism in women leads to clinical features of varied intensity, including early puberty, acne, alopecia, seborrhea, menstrual dysfunction, metabolic syndrome, psychological disorders, virilization and hirsutism (3). Simple laboratory measurement of total and free testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and androstenedione identifies about half of the patients with hyperandrogenism (4).

Hirsutism represents a primary clinical indicator of hyperandrogenism (5) and is defined as the presence of excess body or facial terminal hair growth in females in a male-like pattern, as a result of androgen excess or increased sensitivity of hair follicle to normal levels of androgen (6). The modified Ferriman-Gallwey (F-G) score is used to determine the severity of hirsutism by assessing the extent of hair growth in nine key anatomical sites (7).

The intensity and extension of these clinical manifestations depend on several factors and there is no strict correlation between the intensity of clinical conditions and biochemical alterations (3). Thus, clinical evaluation of hyperandrogenism is recommended to identify the hyperandrogenic women with no alterations in androgen levels detected by current laboratory assays.

Metabolic disorders are found in patients with PCOS, mainly insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, increased risk for glucose intolerance, diabetes mellitus 2, metabolic syndrome, and development of cardiovascular diseases (8). Furthermore, obesity is a common feature of PCOS women of whom 38 to 88% present overweight or obesity (9, 10). There is a close correlation between adiposity and clinical severity in PCOS women, and even smallest reductions in weight generally leads to significant improvements in menstrual regularity, fertility and hyperandrogenic features (9). Therefore, adipose tissue plays an important role in the development and

maintenance of PCOS and influences the severity of both its clinical and endocrine features (11).

Therefore, in this study, we aimed to correlate clinical defined hyperandrogenism assessed by modified F-G score and metabolic variables in PCOS women.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The study was approved by our local Ethical Committee – *Comitê de Ética em Pesquisa* from *Universidade Federal de Minas Gerais*. Informed consent was obtained from all participants after a full explanation of the study.

Subjects

This study included 50 PCOS subjects who were recruited at *Hospital Borges da Costa* at *Universidade Federal de Minas Gerais*, Brazil.

The criteria for PCOS were established according to the Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus (12). Exclusion criteria included diabetes mellitus 1 or 2, auto-immune diseases, kidney disease, cancer, acute inflammatory disease, congenital adrenal hyperplasia, Cushing Syndrome, androgen secretor tumors, thyroid pathologies, hyperprolactinemic diseases, hypo or hypergonadotrophic hypogonadism and pregnant subjects. Subjects under treatment with the following medicines were also excluded: steroids, isotretinoin, cyclosporine, antiretroviral, anti-inflammatory, insulin, metformin and oral contraceptive.

Detailed information about body mass index (BMI) and abdominal circumference (AC) were obtained from each subject. In order to assess hirsutism, modified F-G score (7) was applied through visual method. The density of terminal hairs at upper lip, chin, chest, upper back, lower back, upper abdomen, lower abdomen, upper arms and thighs was visually scored on a scale of zero to four in which zero indicates no terminal hair growth and four indicates full male-pattern hair growth. Total score was calculated. A single examiner scored all subjects to avoid bias in the classification.

Sample collection and laboratory determinations

A serum sample was collected from all subjects which was centrifuged at 2.500 rpm for 20 min for separation. Insulin was measured in *Abbott ARCHITECT*[®] in a chemiluminescent assay. Glucose and testosterone were measured using Vitros, by Johnson and Johnson[®] (New Brunswick/USA), and insulin using *Abbott ARCHITECT*[®] (Chigaco/USA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed in SPSS 13.0 software. In order to evaluate normal distribution, Shapiro-Wilk test was conducted. Spearman correlation was tested in non parametric variables and Pearson's correlation in parametric variables. A 0.05 p value was considered significant.

RESULTS

We evaluated a total of 50 PCOS patients with mean age of 31 (± 5) years old. The majority of the patients were overweight (19/50 – 38%) or obese (19/50 – 38%), considering IMC 25 to 30 kg/m² and > 30 kg/m², respectively. Only 12 women (12/50 – 24%) present IMC < 25 kg/m². Regarding the AC, 12 patients had AC < 88 cm (24%) and 38 showed AC > 88cm (76%). The range of Ferriman-Gallwey score was 0 to 30. The biochemical variables evaluated are presented in Table 1.

Table 1: Clinical and biochemical characteristics of PCOS women.

VARIABLE	Mean or median
Age (range)	31±5 (14-42)
BMI (range)	28.9±5.3 (18.3-40.0)
AC (range)	96.0±13.5 (65.0-142.0)
F-G score (range)	11±7 (0-30)
Fasting glucose	87.1±9.7
Insulin	11.7; 8.6*
Testosterone	58.0±37.1

Values represented as mean \pm standard deviation (parametric variables).

*Median and interquartile range (non parametric variables). Body mass index (BMI), abdominal circumference (AC).

F-G score was correlated with each anthropometric and biochemical variables in PCOS women. A positive correlation was observed with BMI ($p=0.035$; $r=0.302$), AC ($p=0.009$, $r=0.367$) and insulin ($p=0.010$, $r=0.477$) (Figure 1). No linear correlation between fasting glucose ($p=0.654$, $r=0.084$), testosterone ($p=0.218$, $r=0.194$) and F-G score was found.

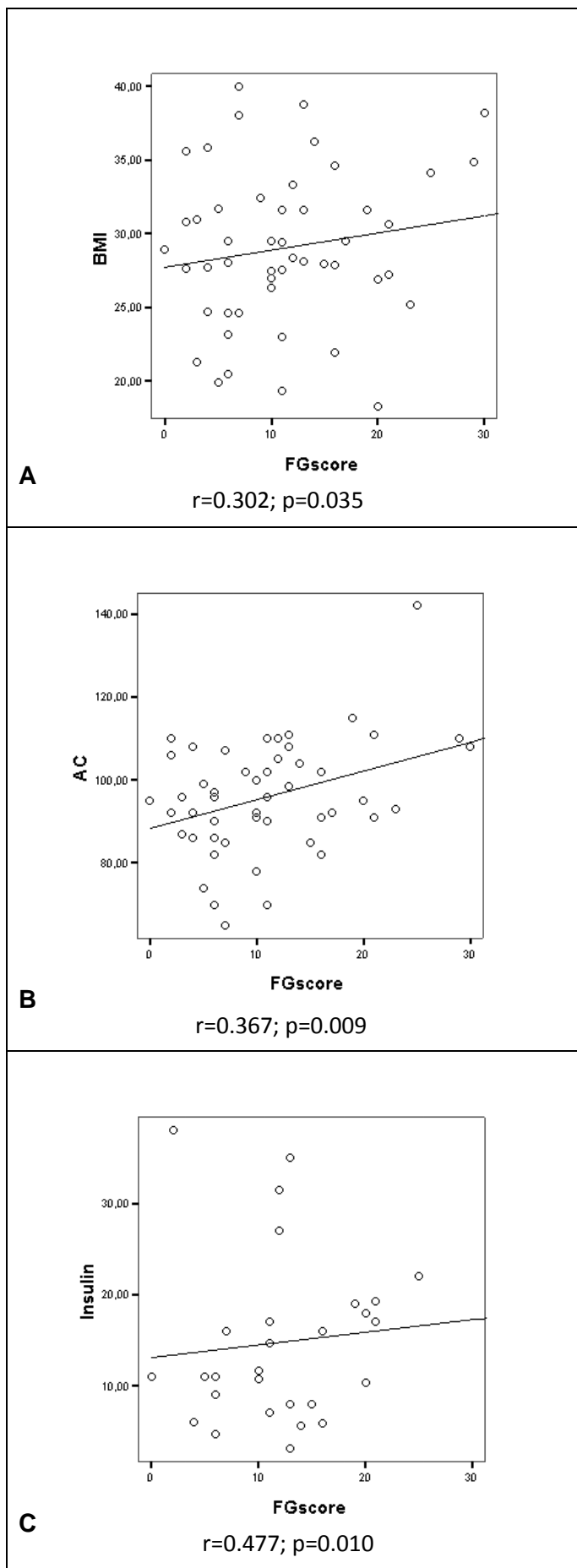


Figure 1 - Scatterplot showing correlation between Ferriman-Gallwey modified score (x axis) and BMI (A), AC (B) and Insulin (C) (y axis). Body mass index (BMI), abdominal circumference (AC). Pearson and Sperman test.

DISCUSSION

Many studies have been performed in order to characterize variables linked to hirsutism in women. Although testosterone is the hormone most commonly evaluated in this condition, some PCOS hirsute women do not present elevated testosterone levels as measured by routine laboratory methods (6). Indeed, we did not observe a correlation between testosterone levels and F-G score, indicating that testosterone levels may not be as sensitive as clinical evaluation to estimate hyperandrogenism.

In contrast, a positive correlation between F-G score versus BMI and F-G score versus AC was observed, suggesting that obesity and abdominal adiposity correlate with higher hirsutism grade in PCOS women. In fact, obesity *per se* represents a condition of sex hormone imbalance in women. Levels of the sex hormone-binding globulin tend to linearly decrease as body fat increases, and this may lead to an increased fraction of free androgens delivered to target sensitive tissues (13). This may particularly occur in the presence of the abdominal phenotype of obesity in which fat abdominal tissue is characterized by specific hormonal and metabolic activities. On the other hand, this type of adipose tissue might increase metabolic syndrome development risk (14). Women with central fat tissue distribution generally have lower sex hormone-binding globulin levels when compared with age- and weight-matched controls with peripheral obesity. Furthermore, women with abdominal obesity have higher testosterone and dihydrotestosterone levels than those with peripheral obesity, which may exceed their metabolic clearance rates (15). Increased production rate is also observed even for androgens not bound to sex hormone-binding globulin, such as androstenedione and dehydroepiandrosterone (16). Therefore, the abdominal phenotype of obesity can be defined as a condition of relative functional hyperandrogenic state.

Fasting glucose did not show correlation with F-G score, as expected, since diabetic women were excluded of this study. However, insulin levels showed a significant and positive correlation with F-G score. This finding suggests that increases in insulin levels, which are associated to insulin resistance as commonly seen in PCOS women, with hirsutism. The clinical and/or biochemical signs of androgen excess in PCOS result from increased synthesis and release of ovarian androgens. Insulin and LH increase synergistically with androgen production. Insulin resistance leads to hyperinsulinaemic condition, reducing SHBG and raising free circulating testosterone (17). Both animal and human models demonstrated the associations between serum testosterone and insulin resistance or metabolic syndrome/diabetes mellitus 2/PCOS

risk in women (18). In addition, hyperinsulemia increases the production of ovarian androgen and insulin growth factors I (IGF-I) and II in liver (19). The direct effect of insulin and IGF-I is the increase in 17-hydroxylase activity in ovaries leading to androgen hyperproduction, mainly androstenedione, testosterone and 17-hydroxyprogesterone (testosterone precursor) (20). Besides, IGF-1 inhibits aromatase which prevents the conversion of testosterone in estrogens and, indirectly, insulin seems to increase LH action in ovaries (21). Hyperinsulinemia also decreases the liver production of SHBG and insulin growth factor binding protein – 1 (the last, the protein which transports IGF-1), contributing to an increased activity of free testosterone and IGF-1, respectively, in target cells (22).

This study analyzed, for the first time, the correlation of F-G score and metabolic features of PCOS associated with insulin resistance and cardiovascular risk. Taken together, our results suggest that F-G score may be a better parameter to evaluate hyperandrogenism and cardiovascular risk in PCOS women. Furthermore, weight loss and insulin resistance control may impact hyperandrogenism status in PCOS women, contributing to better quality of life and preventing further possible complications of this disease. Still, further studies should be conducted to confirm these results in a larger sample and potentially find other clinically relevant correlations in PCOS.

ACKNOWLEDGEMENTS

CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) and FAPEMIG (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais*) for the financial support. Simone Martins Gonçalves and Dalva Maria de Resende for technical support.

REFERENCES

1. Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001; 40(2):433-39.
2. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO, Duleba AJ, Hoeger K, Mason H. et al. PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and Tomorrow. *Clin Endocrinol.* 2011; 74(4):424-433.

3. Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome and insulin-resistant hyperinsulinemia. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 45:S95-104.
4. Sharma NL, Mahajan VK, Jindal R, Gupta M, Lath A. Hirsutism: clinico-investigative profile of 50 indian patients. *Indian J Dermatol.* 2008; 53(3):111–114.
5. Kopera D, Wehr E, Obermayer-Pietsch B. Endocrinology of Hirsutism. *Int J Trichology.* 2010; 2(1):30–35.
6. Hertweck SP, Yoost JL, McClure ME, Siow Y, Brock GN, Wintergerst KA et al. Ferriman-gallwey scores, serum androgen and mullerian inhibiting substance levels in hirstute adolescent girls. *Pediatr Adolesc Gynecol.* 2012; 25(5):300-4.
7. Goodman N, Bledsoe M, Cobin R, Futterweit W, Goldzieher J, Petak S. et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for the clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders. *Endocr Pract.* 2001; 7(2):120-134.
8. Lo JC, Feigenbaum SL, Yang J, Pressman AR, Selby JV, Go AS. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(4):1357-1363.
9. Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 65:137-145.
10. Moran C, Arriaga M, Rodriguez G, Moran S. Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.* 2012; 2012: 317241.
11. Taponen S, Martikainen H, Järvelin MR, Laitinen J, Pouta A, Hartikainen AL. et al. Hormonal profile of women with self-reported symptoms of oligomenorrhea and/or hirsutism: Northern Finland birth cohort 1966 study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(1):141-7.
12. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2004; 19(1):41-7.

13. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto A. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006; 113(10):1148-59.
14. Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev*. 2000; 21(6):697-738.
15. Ivandić A, Prpić-Krizevac I, Bozić D, Barbir A, Peljhan V, Balog Z. et al. Insulin resistance and androgens in healthy women with different body fat distributions. *Wien Klin Wochenschr*. 2002; 114(8-9):321-6.
16. Kurtz BR, Givens JR, Koinindir S, Stevens MD, Karas JG, Bittle JB, et al. Maintenance of normal circulating levels of D4-androstenedione and dehydroepiandrosterone in simple obesity despite increased metabolic clearance rate: evidence for a servo-control mechanism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64:1261-7.
17. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine*. 2010; 8:41.
18. Corbould A. Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome? *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24(7):520-32.
19. Rosenfield RL. Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999; 28:265-93.
20. Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS. Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:2854-64.
21. Cataldo NA. Insulin-like growth factor binding proteins: do they play a role in polycystic ovary syndrome? *Semin Reprod Endocrinol*. 1997; 15:123-36.
22. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of ovary syndrome. *Clin Endocrinol*. 2004; 60:1-17.

6 - CONCLUSÕES

- Níveis elevados de PAI-1, sVCAM-1, PCR e níveis diminuídos de vitamina D estão associados com um estado inflamatório crônico em mulheres com SOP e, juntamente com o índice LAP, podem predizer o risco cardiovascular e resistência à insulina neste grupo.
- O alelo 4G e o genótipo 4G/4G no gene do PAI-1 estão associados ao desenvolvimento da SOP.
- A escala de Ferriman-Gallwey correlacionou-se positivamente com IMC, CA e níveis de insulina, sendo um marcador promissor para avaliar resistência à insulina e risco cardiovascular em mulheres com SOP.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO, Duleba AJ, Hoeger K, Mason H, Homburg R, Hickey T, Franks S, Tapanainen JS, Balen A, Abbott DH, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS (2011) PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and Tomorrow. **Clin Endocrinol.** 74(4): 424-433.
2. Moran L, Teede, H (2009) Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod Update.** 15(4): 477-88.
3. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO (2004) The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. **J Clin Endocrinol.** 89(6):2745-9
4. Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A (2011) Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 40(2): 433-39.
5. Rosenfield RL (2001) Polycystic ovary syndrome and insulin-resistant hyperinsulinemia. **J Am Acad Dermatol.** 45(3): S95-104.
6. Yarak S, Bagatin E, Hassun KM, Parada MOAB, Filho ST (2005) Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. **Ann Bras Dermatol.** 80(4): 395-410.
7. Rosenfield RL (1999) Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 28(2):265-93.
8. Goodarzi MO, Erickson S, Port SC, Jennrich RI, Korenman SG (2005) beta-Cell function: a key pathological determinant in polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 90(1):310-315.
9. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R (2001) Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. **Fertil Steril.** 75(1):53-8.
10. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M (2003). Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 88(5): 2031-6.

11. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM (2001) The Biochemical Basis for Increased Testosterone Production in Theca Cells Propagated from Patients with Polycystic Ovary Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 86(12) 5925-33.
12. Apter D, Butzow T, Laughlin GA, Yen SS. (1994) Accelerated 24-hour luteinizing hormone pulsatile activity in adolescent girls with ovarian hyperandrogenism: relevance to the developmental phase of polycystic ovarian syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 79:119-25.
13. Coffler MS, Patel K, Dahan MH, Malcom PJ, Kawashima T, Deutsch R, Chang RJ (2003) Evidence for Abnormal Granulosa Cell Responsiveness to Follicle-Stimulating Hormone in Women with Polycystic Ovary Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 88(4): 1742–47.
14. Zawadzki JK, Dunaif A (1992) Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, Merriam GR, editors. Polycystic ovary syndrome. Boston, MA: Blackwell 377-384.
15. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks to polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod.** 19(1):41-7.
16. Burgers JA, Fong SL, Louwers YV, Valkenburg O, de Jong FH, Fauser BC, Laven JS (2010) Oligoovulatory and anovulatory cycles in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): what's the difference? **J Clin Endocrinol Metab.** 95(12):E485-9.
17. Homburg R (2008) Polycystic ovary syndrome. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 22(2):261-74.
18. Poretsky L, Smith D, Seibel M, Pazianos A, Moses AC, Flier JS (1984) Specific insulin binding sites in human ovary. **J Clin Endocrinol Metab.** 59(4):809-811.
19. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC (1999) The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocr Rev.** 20(4):535-82.

20. Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS (1996) Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. **J Clin Endocrinol Metab.** 81(8):2854-64.
21. Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr Rev.** 18(6):774-800.
22. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL **Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Tradução por Carlos Henrique de Araújo Cosendey, Marcio Moacyr Vasconcelos, Patricia Vouex e Sérgio Setubal. 11. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2007.
23. Luciano AA, Chapler FK, Sherman BM (1984). Hyperprolactinemia in polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril.** 4(5): 719-25.
24. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP (2009) Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome. **Metabolism.** 58(7): 954-962.
25. Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z (1995) Excessive Insulin Receptor Serine Phosphorylation in Cultured Fibroblasts and in Skeletal Muscle. **J Clin Invest.** 96(2) 801-10.
26. Jaffiol C, Rouard M, Macari F, Lautier C, Ait el Mkaem S, Méchaly I, Brun JF, Renard E, Cros G, Bringer J, Grigorescu F (1999) Insulin resistance: from clinical diagnosis to molecular genetics: implications in diabetes mellitus. **Bull Acad Natl Med.** 183(9) 1761-75.
27. Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI (2002) Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 87(9) 4297-300.
28. Kisdon W (1998) Polycystic ovary syndrome: a new direction in treatment. **Med J Aust.** 169(10):537-40.
29. Cataldo NA (1997) Insulin-like growth factor binding proteins: do they play a role in polycystic ovary syndrome? **Semin Reprod Endocrinol.** 15(2):123-36.

30. Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ (1986) Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. **J Clin Endocrinol Metab.** 62(5):904-10
31. 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.
32. 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.
33. Palmert MR, Gordon CM, Kartashov AL, Legro RS, Emans SJ, Dunaif A (2002) Screening for abnormal glucose tolerance in adolescents with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 87(3):1017-23.
34. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia.** 28 (7): 412–419.
35. Qu HQ, Li Q, Rentfro AR, Fisher-Hoch SP, McCormick JB (2011) The Definition of Insulin Resistance Using HOMA-IR for Americans of Mexican Descent Using Machine Learning. **PLoS One.** 6(6): e21041.
36. Karaer A, Cavkaytar S, Mert I, Buyukkagnici U, Batioglu S (2010) Cardiovascular risk factors in polycystic ovary syndrome. **J Obstet Gynaecol.** 30(4):387-92.
37. Tsutsumi R, Webster NJ (2009). GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. **Endocr J.** 56(6):729-37.
38. McCartney CR (2010). Maturation of sleep-wake GnRH secretion across puberty in girls: potential mechanisms and relevance to the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. **J Neuroendocrinol.** 22(7):701–709.

39. Apter D, Butzow T, Laughlin GA, Yen SS (1995) Metabolic features of polycystic ovary syndrome are found in adolescent girls with hyperandrogenism. **J Clin Endocrinol Metab.** 80(10): 2966-73.
40. Lobo RA, Granger L, Goebelsmann U, Mishell DR Jr (1981) Elevations in unbound serum estradiol as a possible mechanism for inappropriate gonadotropin secretion in women with PCO. **J Clin Endocrinol Metab.** 52(1):156.
41. Heikkilä M (2002) DEVELOPMENT OF THE ADRENOGENITAL SYSTEM - Female sex determination, ovarian and adrenal gland ontogeny regulated by Wnt-4 in mice. (2002) Biocenter Oulu and Department of Biochemistry, University of Oulu.
42. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, Mcallister JM (1999) Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. **Mol Endocrinol.** 13(6):946-957.
43. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM (2001) The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 86(12):5925-33.
44. Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A (2002) Activins, Inhibins, and Follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. **Exp Biol Med.** 227(9):724-52.
45. Vale W, Wiater E, Gray P, Harrison C, Bilezikjian L, Choe S (2004) Activins and inhibins and their signaling. **Ann NY Acad Sci.** 1038:142-47.
46. Perez-Gutierrez JF (1994) The physiology of the hypothalamo-hypophyseal axis. **An R Acad Nac Med.** 111(2):333-36.
47. Gilling-Smith C, Story H, Franks S (1997) Evidence for a primary abnormality in theca cell steroidogenesis in the polycystic ovarian syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf).** 47(1):93-9.
48. Barnes R, Rosenfield RL (1989) The polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment. **Ann Intern Med.** 110:386-99.

49. Nestler JE (1997). Insulin regulation of ovarian androgens. **Hum Reprod.** 12 (1):53-62.
50. Techatraisak K, Conway GS, Rumsby G (1997) Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) gene in hyperandrogenic states. **Clin Endocrinol (Oxf).** 46:131–134.
51. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED, Spina GG, Filandra FA, Tsianateli TC, Bergiele AT, Kouli CR (1999) Polymorphism T–C (234 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril.** 71:431–435.
52. Marszalek B, Lacinski M, Babych N, Capla E, Biernacka-Lukanty J, Warenik-Szymankiewicz A, Trzeciak WH (2001) Investigations on the genetic polymorphism in the region of CYP17 gene encoding 50-UTR in patients with polycystic ovarian syndrome. **Gynecol Endocrinol.** 15:123–128.
53. Unsal T, Konac E, Yesilkaya E, Yilmaz A, Bideci A , Onen HI, Cinaz P , Menevse A (2009) Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. **J Assist Reprod Genet.** 26:205–216.
54. Li H, Chen Y, Yan LY, Qiao J (2012) Increased expression of P450scc and CYP17 in development of endogenous hyperandrogenism in a rat model of PCOS Increased expression of P450scc and CYP17 in development of endogenous hyperandrogenism in a rat model of PCOS. **Endocrine.** DOI: 10.1007/s12020-012-9739-3.
55. Sharma NL, Mahajan VK, Jindal R, Gupta M, Lath A (2008) Hirsutism: clinico-investigative profile of 50 indian patients. **Indian J Dermatol.** 53(3):111–114.
56. Kopera D, Wehr E, Obermayer-Pietsch B (2010) Endocrinology of Hirsutism. **Int J Trichology.** 2(1):30–35.
57. Goodman N, Bledsoe M, Cobin R, Futterweit W, Goldzieher J, Petak SM, Smith KD, Steinberger E; American Association of Clinical Endocrinologists Hyperandrogenic Disorders Task Force. (2001) American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for the clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders. **Endocr Pract.** 7(2):120-134.

58. Alexander CJ, Tangchitnob EP, Lepor NE (2009) Polycystic Ovary Syndrome: A Major Unrecognized Cardiovascular Risk Factor in Women. **Rev Obstet Gynecol.** 2(4):232-9.
59. Xiang SK, Hua F, Tang Y, Jiang XH, Zhuang Q, Qian FJ (2012) Relationship between serum lipoprotein ratios and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Int J Endocrinol.** 2012:173281.
60. Valkenburg O, Steegers-Theunissen RP, Smedts HP, Dallinga-Thie GM, Fauser BC, Westerveld EH, Laven JS (2008) A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. **J Clin Endocrinol Metab.** 93(2):470-6.
61. Talbott E, Clerici A, Berga SL, Kuller L, Guzick D, Detre K, Daniels T, Engberg RA (2001) Adverse lipid and coronary heart disease risk profiles in young women with polycystic ovary syndrome: results of a case-control study. **J Clin Epidemiol.** 51(5):415-22.
62. Filho, GB. **Bogliolo: Patologia.** 7.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.
63. Leuy, K (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. **Cardiovasc Res.** 32(4):733-42.
64. Johnston B, Butcher EC (2002). Chemokines in leukocyte adhesion triggering and migration. **Semin. Immunol.** 14:83-92.
65. Alon R, Feigelson S (2002) From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. **Semin Immunol.** 14(2):93-104.
66. Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, Castellano M, Salvetti M, Monteduro C, De Ciuceis C, Boari G, Valentini U, Cimino A, Sleiman I, Agabiti-Rosei E (2003) Circulating adhesion molecules and carotid artery structural changes in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J Hum Hypertens.** 17(7): 463-70.

67. Overbeek SA, Braber S, Henricks PA, Kleinjan M, Kamp VM, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G (2011) Cigarette smoke induces β 2-integrin-dependent neutrophil migration across human endothelium. **Respir Res.** 1:75.
68. Kubes, P (2002) Introduction: The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol.**14(2):65-72.
69. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T (2006) Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. **Clin Exp Immunol.** 144(3): 494–502.
70. Wang JH, Pepinsky RB, Stehle T, Liu JH, Karpusas M, Browning B, Osborn L (1995) The crystal structure of an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): A cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1- α 4 integrin interaction. **Proc Natl Acad Sci USA** 92: 5714-5718
71. Tozawa H, Kanki Y, Suehiro J, Tsutsumi S, Kohro T, Wada Y, Aburatani H, Aird WC, Kodama T, Minami T (2011) Genome-Wide Approaches Reveal Functional Interleukin-4-Inducible STAT6 Binding to the Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Promoter. **Mol Cell Biol.** 31(11):2196-209.
72. Blüher M, Unger R, Rassoul F, Richter V, Paschke R (2002) Relation between glycaemic control, hyperinsulinemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecule in patients with impaired glucose tolerance or type II diabetes. **Diabetologia.** 45(2):210-216
73. Libby P (2007) Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutr Rev.** 65(12 Pt 2):S140-6.
74. Okemefuna AI, Stach L, Rana S, Buetas AJZ, Gor J, Perkins SJ (2010) C-reactive Protein Exists in an NaCl Concentration-dependent Pentamer-Decamer Equilibrium in Physiological Buffer. **J Biol Chem.** 285(2):1041-1052.
75. Mineo C, Gormley AK, Yuhanna IS, Osborne-Lawrence S, Gibson LL, Hahner L, Shohet RV, Black S, Salmon JE, Samols D, Karp DR, Thomas GD, Shaul PW

- (2005) FcγRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. **Circ Res.** 97(11):1124-31.
76. Tanigaki K, Mineo C, Yuhanna IS, Chambliss KL, Quon MJ, Bonvini E, Shaul PW (2009) C-Reactive Protein Inhibits Insulin Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase via the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif of FcγRIIB and SHIP-1. **Circulation Research.** 104(11): 1275–1282.
77. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW (1999) C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction: A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 19(4): 972-8.
78. Haffner, SM (2003) Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. **Am J Cardiol.** 92(4A):18J-26J.
79. Boulman N, Levy Y, Leiba R, Shachar S, Linn R, Zinder O, Blumenfeld Z (2004) Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. **J Clin Endocrinol Metab.** 89(5):2160-5.
80. Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.** 336(15):1066-71.
81. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P (2000) Glucose challenge stimulates reactive oxygen species generation by leucocytes. **J Clin Endocrinol Metab.** 85(8):2970-3.
82. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev.** 23(5):599-622.
83. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP (2006) Increased activation of nuclear factor κB triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 91(4):1508-12.
84. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A

- (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**. 6(3):315-25.
85. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation in atherosclerosis. **Circulation**. 105(9):1135-43.
86. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J (2001) C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. **Circulation**. 103(9):1194-7.
87. Lujan ME, Chizen DR, Pierson RA (2008). Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: Pitfalls and Controversies. **J Obstet Gynaecol Can**. 30(8):671-9.
88. Liao CH, Li HY, Yu HJ, Chiang HS, Lin MS, Hua CH, Ma WY (2012) Low serum sex hormone-binding globulin: Marker of inflammation? **Clin Chim Acta**. 413(7-8):803-7.
89. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL (2012). Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. **JAMA**. 307(5):491-7.
90. Loskutoff DJ, Samad F (1998)The Adipocyte and Hemostatic Balance in Obesity : Studies of PAI-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 18(1):1-6.
91. Legro, RS (2000). The genetics of obesity. Lessons for polycystic ovary syndrome. **Ann N Y Acad Sci**. 900:193-202.
92. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, Jacobs HS (1995) .Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. **Hum Reprod**. 10(8):2107-11.
93. Moran C, Renteria JL, Moran S, Herrera J, Gonzalez S, Bermudez JA (2008) Obesity differentially affects serum levels of androstenedione and testosterone in polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 90(6):2310-7.
94. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento de Síndrome Metabólica, Sociedade Brasileira de Hipertensão (2005) **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 84 (suplemento I).

95. Després JP, Lemieux I (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**. 444 (7121):881-7.
96. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. 89(6):2548-56.
97. Gregor MF, Hotamisligil GS (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**. 29:415-45.
98. Ahima, RS; Flier, JS (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**. 11(8):327-32.
99. Canello R, Clément K (2006) Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG**. 113(10):1141-7.
100. Skopková M, Penesová A, Sell H, Rádiková Z, Vlcek M, Imrich R, Koska J, Ukropec J, Eckel J, Klimes I, Gasperíková D (2007) Protein array reveals differentially expressed proteins in subcutaneous adipose tissue in obesity. **Obesity (Silver Spring)**. 15(10):2396-406.
101. Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanism in obesity. **Annu Rev Immunol**. 29:415-45.
102. Shaker M, Mashhadani ZIAL, Mehdi AA (2010) Effect of Treatment with Metformin on Omentin-1, Ghrelin and other Biochemical, Clinical Features in PCOS Patients. **Oman Med J**. 25(4): 289–293.
103. Sharma AM (2003). Obesity and cardiovascular risk. **Growth Horm IGF Res**. Suppl A:S10-7.
104. Kahn HS (2005) The “lipid accumulation product” performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. **BMC Cardiovasc Disord**. 5:26.

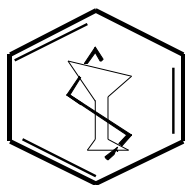
105. Wehr E, Pilz S, Boehm BO, Marz W, Obermayer-Pietsch B (2011) The lipid accumulation product is associated with increased mortality in normal weight postmenopausal women. **Obesity (Silver Spring)**. 19(9):1873-80.
106. Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM (2009) Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**. 24:1726-1731.
107. Jovanović ZB, Ilić M, Zidverc-Trajković J, Pavlović AM, Mijajlović M, Sterić N, Stanković S, Beslač-Bumbasirević L, Kostić VS (2004) Plasminogen activator inhibitor-1 in the evolution of stroke. **Srp Arh Celok Lek**. 132(5-6):143-7.
108. Bombeli T, Jutzi M, De Conno E, Seifert B, Fehr J (2002) In patients with deep-vein thrombosis elevated levels of factor VIII correlate only with von Willebrand factor but not other endothelial cell-derived coagulation and fibrinolysis proteins. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 13(7):577-81.
109. Mehta R, Shapiro AD (2008) Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. **Haemophilia**. 14:1255-1260.
110. Park YJ, Liu G, Lorne EF, Zhao X, Wang J, Tsuruta Y, Zmijewski J, Abraham E (2008) PAI-1 inhibits neutrophil efferocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 105(33):11784-9.
111. Francis, CW (2002) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels and Polymorphisms Association with Venous Thromboembolism. **Arch Pathol Lab Med**. 126(11):1401-4.
112. Garg MK, Dutta MK, Mahalle N (2012) Adipokines (adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1) in metabolic syndrome. **Indian J Endocrinol Metab**. 16(1):116-23.
113. Arndt PG, Young SK, Worthen GS (2005) Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation by Plasminogen Activator Inhibitor-1 through a JNK-Mediated Pathway. **J Immunol**. 175(6):4049-59.

114. Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M (2004) The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. **Eur J Endocrinol.** 150(6):793-8.
115. Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BCJM (2008) Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: polycystic ovary syndrome and ovarian response. **Hum Reprod Update.** 14(5): 459–484.
116. Thomson RL, Spedding S, Buckley (2012) Vitamin D in the etiology and management of polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf).** 77(3):343-50.
117. Peterlik M, Cross HS (2005) Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. **Eur J Clin Invest.** 35(5):290-304.
118. Peterlik M, Boonen S, Cross HS, Lamberg-Allardt C (2009) Vitamin D and Calcium Insufficiency-Related Chronic Diseases: an Emerging World-Wide Public Health Problem. **Int J Environ Res Public Health.** 6(10): 2585-2607.
119. Borges MC, Martini LA, Rogero MM (2011) Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. **Nutrition.** 27(4):399-404.
120. Danescu LG, Levy S, Levy J (2009) Vitamin D and diabetes mellitus. **Endocrine.** 35(1):11-7.
121. Panidis D, Balaris C, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Balaris V, Katsikis I, Zournatzi V, Diamanti-Kandarakis E (2005) Serum Parathyroid Hormone Concentrations Are Increased in Women with Polycystic Ovary Syndrome. **Clin Chem.** 51(9):1691-7.
122. Hahn S, Haselhorst U, Tan S, Quadbeck B, Schmidt M, Roesler S, Kimmig R, Mann K, Janssen OE (2006) Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.** 114(10):577-83.

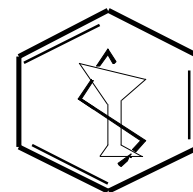
123. Yildizhan R, Kurdoglu M, Adali E, Kulusari A, Yildizhan B, Sahin HG, Kamaci M (2009) Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. **Arch Gynecol Obstet.** 280(4):559-63.
124. Wehr E, Pilz S, Schweighofer N, Giuliani A, Kopera D, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B (2009) Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol.** 161(4):575-82.
125. Mahmoudi T (2009) Genetic variation in the vitamin D receptor and polycystic ovary syndrome risk. **Fertil Steril.** 92(4):1381-3.
126. Wehr E, Gruber HJ, Giuliani A, Möller R, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B (2011) The lipid accumulation product is associated with impaired glucose tolerance in PCOS women. **J Clin Endocrinol Metab.** 96(6):E986-90.
127. Mazloomi S, Sharifi F, Hajihosseini R, Kalantari S, Mazloomzadeh S (2012) Association between Hypoadiponectinemia and Low Serum Concentrations of Calcium and Vitamin D in Women with Polycystic Ovary Syndrome. **ISRN Endocrinol.** 2012: 949427.
128. Lerchbaum E, Giuliani A, Gruber HJ, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B (2012) Adult-type hypolactasia and calcium intake in polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf).** 77(6):834-43
129. Li HW, Brereton RE, Anderson RA, Wallace AM, Ho CK (2011) Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. **Metabolism.** 60(10):1475-8.

8 - ANEXOS

8.1 - Anexo 1 – Ficha clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 FACULDADE DE FARMÁCIA
 DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA CLÍNICA

Projeto de Pesquisa “O PAPEL DAS CITOCINAS E OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS”

I – IDENTIFICAÇÃO:

1. Nome: _____
2. Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____
3. Endereço: _____
4. Telefone: _____
5. Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____
6. Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

1. Sexo: () M () F
2. Estado Civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () divorciado
3. Tabagista: () Não () Sim Quantos cigarros por dia, em média: _____
4. Ex-tabagista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
5. Etilista: () Não () Sim Qual bebida: _____ Quantidade/dia: _____
6. Ex-etilista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
7. Doenças:

- () Hipertensão arterial () Insuficiência cardíaca () Arritmia
 () Doença coronariana () Asma, enfisema () Doença renal
 () Doença hepática () Doença hematológica () Tromboses
 () Neoplasias () Hipotireoidismo () Diabetes
 () Angina Outras: _____

8. Cirurgias prévias: _____

9. Atividade física regular? () Não () Sim : Qual modalidade: _____

Frequência semanal: _____ Duração dos exercícios: _____

10. Diagnóstico de dislipidemia prévia: () Não () Sim Qual: _____

Tempo de diagnóstico: _____ Medicamento em uso e doses: _____

11. Outros medicamentos em uso e dose: _____

12. Faz uso de anticoncepcional? () Não () Sim Há quanto tempo: _____

13. Número de gestações: _____ Intercorrências na gestação? () sim () não

14. Apresenta infertilidade? () sim () não

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1. Etnia: () Caucasiano () Mestiço - mulato, pardo () Negro () Índio () Asiático

2. Pai, mãe ou filhos tem/tinha alguma doença? () Não () Sim
(Qual? _____)

3. Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos) () Não () Sim (Qual e membros afetados? _____)

IV- AVALIAÇÃO METABÓLICA INICIAL:

Peso: _____ Altura: _____

IMC: _____ Circunferência abdominal: _____

Pressão Artéria: _____ Medida do quadril: _____

Outras alterações ao exame: _____

Acantose nigrans () sim () não

Hirsutismo () sim () não

Tireóide () normal () alterada

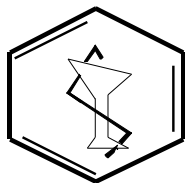
V- CRITÉRIOS SOP

- () Oligo/amenorréia ou Anovulação
- () Hiperandrogenismo clínico ou laboratorial
- () Ultra-som evidenciando ovários micropolicísticos

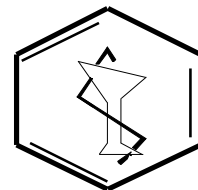
VI – EXAMES RECENTES:

- 1- Glicemia de jejum: _____
- 2- HOMA -IR _____
- 3- Insulina _____
- 4- GPD _____
- 5- CT: _____
- 6- HDL: _____
- 7- LDL: _____
- 8- VLDL: _____
- 9- TG: _____
- 10- Testosterona total: _____
- 11- 17 OH progesterona _____
- 12- FSH _____
- 13- TSH _____
- 14- PRL _____
- 15- Outros _____

8.2 - Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa “O PAPEL DAS CITOCINAS E OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS”

Prezado(a) Senhor(a) ou responsável,

A pesquisa que você está sendo convidado a participar como voluntário (a) é um estudo científico que tem o objetivo de detectar algumas alterações genéticas em citocinas relacionadas à síndrome dos ovários policísticos. O benefício que você receberá será através da possibilidade de conhecimento da presença de possíveis alterações genéticas e suas implicações, importantes para que o clínico possa planejar melhor o tratamento adequado e possa investigar também a sua família com relação a esta alteração. Os indivíduos participantes serão selecionados no Hospital das Clínicas, em Belo Horizonte. Nesta pesquisa, cada participante deve participar de uma única entrevista e responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e deve doar uma única amostra de sangue, na qual serão realizados vários exames laboratoriais gratuitos cujos resultados serão encaminhados para o seu médico. A coleta de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada no próprio Hospital das Clínicas, por um profissional treinado, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias. Na coleta de 16 mL de sangue será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo).

O nome do participante e, também, os resultados dos exames serão mantidos em segredo e privacidade, sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores.

Caso você não queira participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento ou na assistência recebida pelo seu médico.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato, por telefone, com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir.

Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa – Tel: (31) 34996896 / 93061124.

Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges – Tel: (31) 84820894

Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Mirelle Oliveira Sôter –Tel. (35) 91350572

Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Agradecemos pela sua valiosa participação!

PARTICIPANTE

Como participante deste projeto de pesquisa, declaro estar de acordo com os objetivos propostos no mesmo, bem como doar uma amostra de sangue para a realização dos exames laboratoriais.

Nome: _____

Documento de Identificação: _____ ou
responsável: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do pesquisador _____

Data: _____

9 – Adendos

9.1 - Adendo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0379.0.203.000-11

Interessado(a): **Profa. Marinez de Oliveira Sousa**
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de setembro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**O papel das citocinas e os parâmetros bioquímicos na síndrome de ovários policísticos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2 – Adendo 2 – Carta de submissão artigo 1

Dear Dr Karina Gomes

Thank you for submitting 'PAI-1, CRP, sVCAM-1, 25OHD, and LAP index as predictors of insulin resistance and cardiovascular risk in Polycystic Ovary Syndrome women' to Clinical Endocrinology.

Your paper is now being processed. You can keep track of the progress of your manuscript through its review by logging into your author centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/cen>. We will also write to you again as soon as your paper has been peer reviewed.

Please mention the manuscript number in all future correspondence or when calling the office with questions. If there are any corrections to your street address or e-mail address, please let us know.

Please note that we cannot publish your paper until we have received an Authors Declaration form, Conflict of Interest form and a signed Copyright Transfer Agreement or Online Open form.

Yours sincerely

Clinical Endocrinology Editorial Office

9.3 - Adendo 3 - Carta de submissão artigo 2

From: susana.benedet@gu.se
Date: Mon, 19 Nov 2012 04:29:49 -0500 (EST)
Subject: Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica (AOGS) -
Manuscript ID AOGS-12-0831
To: karinabgb@gmail.com

19-Nov-2012

Dear Dr Gomes:

Your manuscript entitled "Ferriman - Gallwey score correlates with obesity and insulin levels in women with Polycystic Ovary Syndrome" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica (AOGS).

Your manuscript ID is AOGS-12-0831.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/aogs> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/aogs> .

Thank you for submitting your manuscript to Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica (AOGS).

Sincerely,
Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica (AOGS) Editorial Office

9.4 – Adendo 4 - Certificado de apresentação do trabalho 1

certificamos que

MARIANA FERREIRA SALES

participou do


Salvador **46°**
Congresso Brasileiro
de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial
 Exposição Técnico-Científica
4 a 7 de setembro de 2012
 Centro de Convenções da Bahia

A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial

na qualidade de autor responsável do tema livre "**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL EM MULHERES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**", tendo como co-autores "SOTER, M. O., CANDIDO, A. L., FERREIRA, C. N., BORGES, K. B. G.".


José Carlos Lima

Presidente do 46º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Ulysses Moraes de Oliveira

Coordenador da Comissão Científica do 46º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Paulo Sérgio Roffé Azevedo

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

realização



9.5 – Adendo 5 - Certificado de apresentação do trabalho 2

certificamos que

MIRELLE OLIVEIRA SOTER

participou do

Sulvador **46º**
**Congresso Brasileiro
 de Patologia Clínica
 Medicina Laboratorial**
 Exposição Técnico-Científica
 4 a 7 de setembro de 2012
 Centro de Convenções da Bahia

A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial

na qualidade de autor responsável do tema livre "AVALIAÇÃO METABÓLICA DE MULHERES OBESAS E NÃO OBESAS COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS", tendo como co-autores "SALES, M. F., FERREIRA, C. N., SOUZA, M. O., BORGES, K. B. G.".


José Carlos Lima

Presidente do 46º Congresso
 Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial



Ulysses Moraes de Oliveira

Coordenador da Comissão Científica do 46º Congresso
 Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial



Paulo Sérgio Roffé Azevedo

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /
 Medicina Laboratorial

realização

