

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

JULIANE DE CARVALHO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO TAFI E DO PAI-1 E SUA ASSOCIAÇÃO
COM PARÂMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS EM
MULHERES PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

BELO HORIZONTE

2017

JULIANE DE CARVALHO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO TAFI E DO PAI-1 E SUA ASSOCIAÇÃO
COM PARÂMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS EM
MULHERES PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Cláudia Natália Ferreira

COORIENTADORA: Prof.^a Dra. Karina Braga Gomes Borges

BELO HORIZONTE

2017

A345a Albuquerque, Juliane de Carvalho.
Avaliação dos polimorfismos do TAFI e do PAI-1 e sua associação com parâmetros clínicos, bioquímicos e hemostáticos em mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos/ Juliane de Carvalho Albuquerque. – 2017.
94 f. : il.

Orientadora: Cláudia Natália Ferreira.
Coorientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Ovário – doenças - Teses. 3. Trombina – Teses. 4. Inibidor 1 de ativador de plasminogênio. 5. Poliformismo (Genética) – Teses. I. Ferreira, Cláudia Natália. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:618.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO


AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO TAFI (INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA) E DO PAI-1 (INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1) E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS EM MULHERES PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

JULIANE DE CARVALHO ALBUQUERQUE

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 04 de outubro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Cláudia Natália Ferreira - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Profa. Karina Braga Gomes Borges
Universidade Federal de Minas Gerais


Profa. Ana Paula Lucas Mota
UFMG


Profa. Alamanda Kwoury Pereira
UFMG

Belô Horizonte, 4 de outubro de 2017.

Dedico esse trabalho aos meus pais, a minha base, meu alicerce. É impagável a sensação de ver o sorriso no rosto da minha mãe diante das minhas conquistas. E quanto ao meu pai, de uma coisa eu tenho certeza: onde quer que ele esteja agora, está em festa por tudo isso.

Agradecimentos

Todos os passos que eu dei para chegar até aqui primeiro foram planejados por Deus. Sou eternamente grata ao Senhor por me permitir vencer mais um desafio.

À minha orientadora, a querida professora Dra. Cláudia Natália Ferreira, que acreditou que tudo isso seria possível quando até eu mesma duvidei. Obrigada pelo “sim” que você me deu quando te procurei pela primeira vez. Você me ensinou muito além de assuntos técnicos, me ensinou sobre a vida. Agradeço por cada e-mail, cada mensagem no celular, cada ligação, cada instrução. Obrigada por todo conhecimento transmitido com tanta dedicação e paciência, por contribuir tanto com a minha formação!

À doce Dra. Karina Braga Gomes Borges, minha coorientadora, quero agradecer pelo carinho com que me acolheu no laboratório e por estar sempre por perto. Obrigada pelas vezes em que, com muita calma e um tom de voz tão sereno, me ajudou a controlar a minha ansiedade nos mais diversos momentos. Obrigada pela fundamental contribuição para meu crescimento!

Às minhas irmãs Simone e Suzane simplesmente por serem quem são: partes de mim. Agradeço por cada palavra e cada gesto de incentivo. Tudo fica mais fácil com o apoio de vocês.

À minha mãe, minha luz, a forma física do que eu entendo por amor, quero agradecer por ter iniciado todo esse processo a partir de uma simples conversa. Obrigada por acreditar em mim, por sonhar junto comigo e por caminhar comigo. Obrigada por me ensinar, desde sempre, a importância do conhecimento!

Manoel, meu amor, toda forma de gratidão é pequena diante do que você fez por mim para que esse sonho se tornasse real. Obrigada pelas diversas vezes em que você colocou seus projetos em segundo plano para que eu pudesse dar continuidade nos meus. Obrigada por entender a minha ausência nos inúmeros dias e noites, nas mais diversas situações. Obrigada por me levantar todas as vezes em que o cansaço me desanimou, por cada lágrima minha que você enxugou, por ser sempre tão compreensivo nos meus momentos de estresse. Você faz parte dessa conquista, seu apoio e dedicação foram fundamentais para tudo isso acontecer.

Agradeço à Tê e ao Haruf, minha segunda mãe e meu segundo pai, pela ajuda de sempre, por estarem sempre de olho, sempre disponíveis. Obrigada por todo cuidado!

Agradeço à Claire Marie, minha filhota de quatro patas, por se contentar com o pouco tempo que eu tinha para me dedicar a ela e por abanar o rabinho com tanta alegria sempre que eu podia parar uns minutinhos para brincar.

Aos meus colegas do laboratório e às novas amigas que ganhei no caminho, agradeço por tornarem mais leve a caminhada. De um modo especial e com muito carinho, agradeço à Franciele de Souza, que tanto me ensinou e contribui para o meu trabalho! Pela grande contribuição para meu crescimento científico, agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da UFMG.

Cada um coloca seu ponto final onde quer, onde pode. Colocá-lo o mais longe possível obriga-nos a ser um pouco mais sábios e um pouco menos pretensiosos.

Jean Yves Leloup

Resumo

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma das endocrinopatias mais comuns entre mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo. Suas características típicas compreendem hiperandrogenismo, oligomenorréia, anovulação e ovários com morfologia policística que podem causar diversas complicações reprodutivas e metabólicas como resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2. Além disso, mulheres portadoras da SOP apresentam distúrbios hemostáticos com prejuízo no sistema fibrinolítico, o que aumenta o risco de eventos cardiovasculares. O Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina (TAFI) e o Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1 (PAI-1) desempenham importante papel na regulação do sistema fibrinolítico. Diversos estudos demonstraram que as mulheres com SOP apresentam níveis elevados de TAFI e PAI-1, o que compromete seu potencial fibrinolítico, além disso, vários polimorfismos do gene do *TAFI* e do *PAI-1* tem sido descritos associados aos níveis plasmáticos dessas proteínas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as frequências dos polimorfismos rs3742264, rs1926447 e rs940 do gene do *TAFI* e dos polimorfismos rs2227631 e rs1799889 do gene do *PAI-1* e sua correlação com os parâmetros metabólicos, hormonais e hemostáticos em mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos. Foi selecionado um total de 97 mulheres com SOP (caso) diagnosticadas de acordo com os critérios de Rotterdam e 99 mulheres hígdas (controle). Foram obtidas amostras de sangue venoso para as análises bioquímicas e extração do DNA. Os polimorfismos foram analisados por meio de técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR alelo-específica, PCR seguida de restrição enzimática - RFLP e PCR em tempo real). Foram encontrados níveis elevados de TAFI e PAI-1 nas portadoras da SOP. Portadoras do genótipo GG do rs940 apresentaram níveis mais elevados de TAFI tanto na avaliação individual do grupo SOP, quanto na avaliação de toda a população em um único grupo. Mulheres com SOP carreadoras do genótipo AA do polimorfismo rs2227631 do gene do *PAI-1* apresentaram níveis mais elevados dessa proteína em comparação ao grupo controle. A análise multivariada de regressão logística apresentou associação independente dos níveis de TAFI, de testosterona e a circunferência abdominal com a SOP. Os resultados encontrados sugerem que os níveis plasmáticos de TAFI e PAI-1 foram associados com o desenvolvimento da SOP, os polimorfismos do *TAFI* e do *PAI-1* influenciaram

em seus níveis plasmáticos, além da associação independente do TAFI, da testosterona e da circunferência à síndrome.

Palavras-chave: Síndrome do ovário policístico. Ovário – doenças – Teses. Trombina - Teses. Inibidor 1 de ativador de plasminogênio. Polimorfismo (Genética) - Teses.

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most frequent endocrinopathies amongst women of reproductive age. Its typical characteristics include hyperandrogenism, oligomenorrhea, anovulation and polycystic ovarian morphology that can lead to various reproductive and metabolic complications, such as insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. In addition, women with PCOS present hemostatic disorders with damage to the fibrinolytic system, which increases the risk of cardiovascular events. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) play an important role in the regulation of the fibrinolytic system. Several studies have shown that women with PCOS have high levels of TAFI and PAI-1, this compromises their fibrinolytic potential, and several polymorphisms of the TAFI and PAI-1 gene have been described associated with the plasma levels of these proteins. This study was conducted in order to investigate frequencies of polymorphisms rs3742264, rs1926447 e rs940 of *TAFI* gene as well polymorphisms rs2227631 e rs1799889 of *PAI-1* gene and their correlations with metabolic parameters, hormonal and hemostatic in women with PCOS. Ninety-seven women with PCOS diagnosed according to the Rotterdam criteria and 99 women without the syndrome (control) were selected. Venous blood samples were obtained for biochemical analysis and DNA extraction. The polymorphisms were analyzed using Polymerase Chain Reaction techniques (allele-specific PCR, PCR followed by enzyme restriction - RFLP and real-time PCR). Patients with PCOS presented elevated levels of TAFI and PAI-1. Carriers of rs940GG genotype had higher levels of TAFI in both individual evaluation of the PCOS group and the evaluation of entire population in a single group. Women with PCOS carrying AA genotype of rs2227631 polymorphism of PAI-1 gene presented higher levels of this protein compared to the control group. The multivariate logistic regression model showed an independent association of TAFI levels, testosterone and abdominal circumference in PCOS. The results suggest that plasma levels of TAFI and PAI-1 were associated with the development of PCOS, and that TAFI and PAI-1 polymorphisms influenced their plasma levels, as well as the independent association of TAFI, testosterone and circumference with the syndrome.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, TAFI, PAI-1, hypofibrinolysis, polymorphisms.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação do modelo de coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação	30
Figura 2 – Representação esquemática da degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico	32
Figura 3 – Ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina	33
Figura 4 – Gene do <i>TAFI</i> e seus polimorfismos já descritos	34
Figura 5 – Gene do <i>PAI-1</i> e seus principais polimorfismos já descritos	36
Figure 1 – Plasma TAFI and PAI-1 levels from PCOS and control groups	62
Figure 2 – Correlations between TAFI levels and hemostatic and biochemical parameters and cardiovascular risk factors	63
Figure 3 – Correlations between PAI-1 levels and hemostatic and biochemical parameters and cardiovascular risk factors	64

Lista de tabelas

Table 1 – Clinical and biochemical characteristics from PCOS and control groups ..	57
Table 2 – TAFI levels according to the genotypes of the polymorphisms rs3742264, rs1926447 and rs940	58
Table 3 – TAFI levels according to recessive and dominant model of inheritance for the polymorphisms rs3742264, rs1926447 and rs940	59
Table 4 – PAI-1 levels according to the genotypes of the polymorphisms rs2227631 and rs1799889	60
Table 5 – PAI-1 levels according to recessive and dominant	61
Table 6 – Multivariate logistic regression among the groups studied	61
Table 1s – Allelic and genotypic frequency of <i>TAFI</i> polymorphisms in PCOS and control groups	65
Table 2s – Haplotype distribution of <i>TAFI</i> gene (rs3742264, rs1926447 and rs940) in PCOS and control groups	66
Table 3s – Allelic and genotypic frequency of <i>PAI-1</i> polymorphisms in PCOS and control groups	66
Table 4s – Haplotype distribution of <i>PAI-1</i> gene (rs2227631 and rs1799889) in PCOS and control groups	66

Lista de Abreviações e Siglas

a – ativado

ACTH – Hormônio adenocorticotrópico

AES – *Androgen Excess Society*

ASRM – *American Society for Reproductive Medicine*

AT – Antitrombina

CA – Circunferência abdominal

CT – Colesterol total

DCV – Doença cardiovascular

D-Di – Dímero D

DHEA – Desidroepiandrosterona

DHEAS – Sulfato de desidroepiandrosterona

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

ESHRE – *The European Society of Human Reproduction and Embryology*

F – Fator

FSH – Hormônio folículo estimulante

FT – Fator tissular

FvW – Fator von Willebrand

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR – *Homeostasis Model assessment – Insulin Resistance*

IGF-I – Fator de crescimento insulínico-I

IGFPB-I – Proteína transportadora ou ligante de IGF-I

IMC – Índice de massa corporal

LAP – *Lipid Accumulation Product*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH – Hormônio luteinizante

NIH - *National Institute of Health*

OMS – Organização mundial da saúde

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

PC – Proteína C

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDF – Produtos de degradação da fibrina

PS – Proteína S

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RI – Resistência à insulina

SERPIN – Inibidores de serina proteases

SHBG – Globulina ligadora de hormônios sexuais

SNPs – Polimorfismos de único nucleotídeo

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

TAFI – Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina

TAFIa – TAFI ativado

TFPI – Inibidor da via do fator tissular

TG – Triglicérides

t-PA - *Tissue-type plasminogen activator*

u-PA - *Urokinase-type plasminogen activator*

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

α 2-AP – α 2-antiplasmina

Sumário

1 Introdução	17
2 Objetivos	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 Referencial teórico	21
3.1 Síndrome dos Ovários Policísticos	21
3.2 Hiperandrogenismo	22
3.3 Disfunção neuroendócrina e adrenal	23
3.4 Resistência à insulina, hiperinsulinemia e diabetes mellitus	23
3.5 Obesidade e dislipidemia na SOP	25
3.6 Diagnóstico da SOP	27
3.7 Hemostasia	28
3.7.1 Coagulação	28
3.7.2 Fibrinólise	32
3.8 Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)	33
3.9 Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)	36
3.10 SOP e alterações hemostáticas	37
4 Capítulo 1	39
5 Discussão	68
6 Considerações Finais	74
7 Referências	75
8 Anexos	86
9 Apêndice	91

1 Introdução

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um dos distúrbios endócrinos mais comuns em mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo, com prevalência aproximada de 7-15% (AZZIZ, 2016; KOKOSAR *et al.*, 2016; LIZNEVA *et al.*, 2016). Hiperandrogenismo, oligomenorréia, anovulação e ovários com morfologia policística são as características típicas da SOP e podem levar a complicações reprodutivas, metabólicas e psicológicas, como ansiedade e depressão (KOKOSAR *et al.*, 2016). Dentre as desordens metabólicas associadas a esta síndrome, destacam-se a resistência à insulina com hiperinsulinemia compensatória, risco elevado de intolerância à glicose e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (PASQUALI *et al.*, 2011). Além disso, as portadoras da síndrome dos ovários policísticos apresentam elevado risco para morbidade cerebrovascular, doença arterial coronariana e dislipidemia aterogênica (LIZNEVA *et al.*, 2016).

Distúrbios nos sistemas de coagulação e fibrinólise também são frequentemente encontrados nas mulheres com SOP, incluindo o estado pró-trombótico, o qual é caracterizado por hipercoagulabilidade e hipofibrinólise (VAUGHAN, 2011; SHAN *et al.*, 2013). A redução da fibrinólise está associada classicamente ao desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio (LONGSTAFF & KOLEV, 2015), o que justifica a maior prevalência deste desfecho em mulheres com SOP. Assim, o desequilíbrio hemostático contribui para eventos cardiovasculares (TOFLER *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016) e marcadores da atividade hemostática possuem valor preditivo importante para essas doenças (GONG *et al.*, 2012; MANSUR & FAVARATO, 2012; CAGLIYAN *et al.*, 2013).

Diversos estudos evidenciaram a importância do Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina (TAFI) e do Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1 (PAI-1) na regulação da fibrinólise (CRAEN *et al.*, 2012; IWAKI *et al.*, 2012; LONGSTAFF & KOLEV, 2015; PLUG & MEIJERS, 2016). Alguns estudos demonstraram que as mulheres com SOP apresentam níveis elevados de PAI-1 (MANNERAS-HOLM *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015) e TAFI (DE MENDONÇA-LOUZEIRO *et al.*, 2013; DE MENDONÇA-LOUZEIRO *et al.*, 2015), o que compromete seu potencial fibrinolítico. Além disso, vários polimorfismos do gene do *TAFI* e do *PAI-1* têm sido descritos associados aos níveis dos respectivos antígenos, sugerindo, dessa forma, que os

níveis plasmáticos de marcadores da fibrinólise teriam importante domínio genético (NADERI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; PLUG & MEIJERS, 2015; WANG *et al.*, 2015). Tendo em vista a elevada prevalência da SOP e suas complicações cardiovasculares, torna-se pertinente a avaliação do papel do TAFI e do PAI-1, como importantes marcadores da atividade fibrinolítica, em mulheres com SOP e, oportunamente, sua associação com os polimorfismos dos genes *TAFI* e *PAI-1*, bem como a correlação com parâmetros bioquímicos e hemostáticos. Na população brasileira, essa relação ainda não foi investigada.

O presente trabalho contribui de maneira efetiva para aumentar o entendimento da relação entre SOP e as doenças cardiovasculares, além de proporcionar novas abordagens para diagnóstico e terapêutica.

Diante do exposto, surgiram algumas indagações que nortearam esse estudo, a saber:

- Os níveis de TAFI e PAI-1 estão elevados em mulheres com SOP quando comparado a um grupo controle hígido?
- Como se comportam as distribuições dos alelos e genótipos dos genes do *TAFI* e *PAI-1* em mulheres com SOP em relação às participantes híginas?
- Como os alelos e os genótipos dos marcadores da fibrinólise influenciam parâmetros metabólicos, hormonais e bioquímicos nos grupos de mulheres estudadas?
- Os parâmetros hemostáticos podem ser influenciados pelos polimorfismos do *TAFI* e *PAI-1*?

Desta forma, acredita-se que o presente estudo poderá contribuir para:

- Maior conhecimento do papel de TAFI e PAI-1, bem como de polimorfismos em seus genes na SOP.
- Melhor entendimento sobre a influência exercida por estes polimorfismos nos marcadores da fibrinólise, no metabolismo hormonal e bioquímico.
- Maior conhecimento das possíveis interações entre os genótipos de *TAFI* e *PAI-1* e fatores de risco cardiovascular na população estudada.

- Entendimento entre as relações dos polimorfismos dos marcadores da fibrinólise com os níveis plasmáticos do marcador de hipercoagulabilidade dímero-D em mulheres hípidas e com SOP.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as frequências de polimorfismos nos genes do *TAFI* e do *PAI-1* e correlacioná-las com os níveis plasmáticos destas proteínas, bem como com parâmetros metabólicos, hormonais e hemostáticos em mulheres com a síndrome dos ovários policísticos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Comparar, entre o grupo de mulheres com SOP e um grupo de mulheres hígdas, os seguintes parâmetros:

- A frequência dos polimorfismos rs1926447 (Thr325Ile), rs3742264 (Ala147Thr) e rs940 (1542C>G) do gene do *TAFI*;
- A frequência dos polimorfismos rs2227631 (-844A>G) e rs1799889 (-675 4G>5G) do gene do *PAI-1*;
- Os níveis de TAFI, PAI-1 e dímero-D.

2.2.2 Correlacionar a presença dos polimorfismos citados com os níveis de TAFI e PAI-1, bem como com outros parâmetros metabólicos, hormonais e hemostáticos nos dois grupos estudados;

2.2.3 Avaliar a associação independente das variáveis estudadas com a SOP.

3 Referencial teórico

3.1 Síndrome dos Ovários Policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a disfunção endócrina mais comum em mulheres em idade reprodutiva de todo o mundo, com prevalência aproximada de 7-15% e apresentando grande heterogeneidade no seu quadro clínico. Embora sua fisiopatologia seja desconhecida, pode-se afirmar que o hiperandrogenismo, a resistência à insulina e alterações na dinâmica das gonadotrofinas são os mais importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos (AZZIZ, 2016; KOKOSAR *et al.*, 2016).

A SOP foi originalmente descrita em 1935 por Stein e Levethal como uma desordem reprodutiva caracterizada por oligomenorréia, hirsutismo (hiperandrogenismo) e morfologia de ovários policísticos (STEIN & LEVENTHAL, 1935).

Atualmente, a síndrome é associada a alterações metabólicas como a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória, que são aceitas como principais fatores ligados à alteração da síntese e metabolismo de andrógenos, além de risco elevado de intolerância à glicose, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Disfunção menstrual, infertilidade, diabetes gestacional e complicações neonatais são transtornos reprodutivos e obstétricos também relacionados (PASQUALI *et al.*, 2011; SHIVAPRAKASH *et al.*, 2013; LIZNEVA *et al.*, 2016).

Algumas hipóteses tentam explicar a fisiopatologia das alterações hormonais nas mulheres com SOP, dentre as quais: 1) aumento da produção dos andrógenos ovarianos resultante da falha na síntese de esteroides; 2) irregularidade na ação e secreção da insulina, gerando resistência à insulina e hiperinsulinemia; 3) defeito primário neuroendócrino que provoca aumento da frequência de pulso e amplitude do hormônio luteinizante (LH); e 4) elevação da síntese dos andrógenos adrenais (DIAMANTI-KANDARAKIS & DUNAIF, 2012; CONWAY *et al.*, 2014; HAYES *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016).

3.2 Hiperandrogenismo

As diretrizes e consensos a respeito do diagnóstico da SOP utilizam os termos “hiperandrogenemia” e “hiperandrogenismo” em suas definições. O termo hiperandrogenemia (ou hiperandrogenismo bioquímico) refere-se ao aumento das concentrações de andrógenos no sangue, enquanto o hiperandrogenismo é o termo utilizado para descrever os sinais clínicos em decorrência do aumento da ação desses andrógenos. O quadro clínico do hiperandrogenismo é de gravidade variável, podendo provocar efeitos sistêmicos que vão de hirsutismo, acne, alopecia, distúrbios menstruais e infertilidade, além de virilização, até obesidade central e disfunções psicológicas (AZZIZ *et al.*, 2009; BARTH *et al.*, 2010).

Os andrógenos podem ser sintetizados pela via do colesterol e/ou pela “via de atalho” a partir da deidroepiandrosterona circulante. Os principais andrógenos circulantes são a testosterona, androstenediona, deidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS). A fisiopatologia das manifestações cutâneas do hiperandrogenismo pode ser justificada pelo fato de que a pele e a unidade pilossebácea são estruturas alvo dos andrógenos que expressam diversos receptores para estes hormônios (CHEN & ZOUBOULIS, 2009; BIASON-LAUBER *et al.*, 2013). Dentre as manifestações cutâneas, o hirsutismo é a mais frequente e pode causar influências psicológicas negativas, especialmente em mulheres mais jovens (ESCOBAR-MORREALE *et al.*, 2012). Sua presença tem sido quantificada através da utilização da escala de *Ferriman-Gallwey*, que avalia o crescimento excessivo de pelos terminais com padrão de distribuição masculino na face e no corpo das mulheres. Nesse método, são avaliadas diferentes áreas do corpo, como lábio superior, queixo, peito, abdômen, costas, braços e coxas, numa escala de 0 a 4, onde 0 representa ausência de pelos e 4, extenso crescimento (MARCONDES *et al.*, 2011; HERTWECK *et al.*, 2012). O valor considerado determinante para confirmar a presença de hirsutismo é ≥ 8 (ESCOBAR-MORREALE *et al.*, 2012).

3.3 Disfunção neuroendócrina e adrenal

A elevação do pulso gerador do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), com consequente secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH) e relativa deficiência do hormônio folículo estimulante (FSH), são conhecidas anormalidades neuroendócrinas quase universais em mulheres com SOP. A persistência da frequência de pulso do GnRH favorece a produção de LH superior ao FSH. O aumento da frequência de pulso do LH, subsequentemente, promove a produção de andrógenos pelas células da teca, enquanto a relativa deficiência do FSH interfere na aromatização dos estrógenos e prejudica a maturação folicular e ovulação (SOLORZANO *et al.*, 2012).

O LH e o FSH estimulam o ovário a produzir e inibir o estrógeno para regular o ciclo menstrual, enquanto o estrógeno gera um *feedback* negativo pela inibição da produção de GnRH no hipotálamo (MOBEEN *et al.*, 2016).

Estima-se que 25% da produção de testosterona e androstenediona sejam de origem ovariana, 25% de origem adrenal e 50% são produzidos nos tecidos periféricos, ao passo que a síntese de DHEA e DHEAS é de responsabilidade exclusiva do córtex adrenal. Nos casos de SOP, há um aumento na produção de andrógenos pelas adrenais em aproximadamente 25%, possivelmente resultantes de traços genéticos ou secundários à secreção anormal de andrógenos ovarianos (PASQUALI *et al.*, 2011; DAY *et al.*, 2015).

3.4 Resistência à insulina, hiperinsulinemia e diabetes mellitus

A insulina exerce um papel central na manutenção da homeostase da glicose estimulando sua captação pelos tecidos-alvo, adipócitos e músculos, além de suprimir a glicogenólise hepática (DIAMANTI-KANDARAKIS & DUNAIF, 2012). Mulheres com SOP apresentam resistência à insulina (RI) intrínseca, independentemente de obesidade e hiperinsulinemia compensatória. Conforme dito anteriormente, a RI predispõe ao desenvolvimento de diabetes, síndrome metabólica e a doenças cardiovasculares (CASSAR *et al.*, 2015).

Receptores de insulina estão presentes nos ovários tanto de mulheres saudáveis, quanto das mulheres com SOP. Além disso, o receptor do fator de crescimento insulínico tipo I (IGF-I), uma tirosina-quinase que compartilha considerável homologia estrutural e funcional com o receptor de insulina, também está presente nos ovários.

Em decorrência dessa homologia entre os receptores, a insulina pode ligar-se ao receptor de IGF-I e ativá-lo, bem como o IGF-I pode também ligar-se ao receptor de insulina e torná-lo ativo (DIAMANTI-KANDARAKIS & DUNAIF, 2012). A hiperinsulinemia aumenta a produção de andrógenos nos ovários e dos fatores de crescimento no fígado. A insulina e o IGF-I promovem o aumento da atividade da 17-hidroxilase nos ovários o que resulta em hiperprodução androgênica, principalmente de androstenediona, de testosterona e do seu precursor, a 17-hidroxiprogesterona. O IGF-I inibe a enzima aromatase impedindo a conversão da testosterona em estrógenos (DUNAIF, 1997). A insulina também pode agir de forma indireta potencializando a ação do LH nos ovários. A hiperinsulinemia tem ainda o efeito de reduzir a produção hepática da globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG) e de IGFBP-I, proteína transportadora ou ligante de IGF-I, contribuindo para ação mais ampla da testosterona livre e IGF-I nas células-alvo (NESTLER, 1997).

A RI pode ser definida como o comprometimento da resposta fisiológica à insulina endógena e exógena, e pode refletir em distúrbios metabólicos. A redução da ligação da insulina aos seus receptores, defeitos pós-receptor ou até uma diminuição dos sítios dos receptores da insulina nos tecidos-alvos são alguns dos mecanismos envolvidos com a RI. No entanto, a natureza exata desse distúrbio na maioria das mulheres com SOP ainda não é bem compreendida (CASSAR *et al.*, 2015).

O *Homeostasis Model assessment – Insulin Resistance* (HOMA-IR) é amplamente utilizado para estimativa de RI. Seu cálculo é realizado através da multiplicação dos valores plasmáticos da insulina em jejum e da concentração plasmática de glicose em jejum, sendo o resultado dividido por 22,5. Níveis elevados do HOMA-IR representam o estado inicial de hiperinsulinemia em mulheres portadoras da SOP (QU *et al.*, 2011). Alguns estudos apontam uma relação bidirecional entre hiperandrogenismo e RI. A insulina pode aumentar a produção de andrógenos ovarianos LH-dependente, especialmente nas células da teca em mulheres com SOP. Além disso, foi demonstrado que a administração de testosterona pode induzir RI e alteração na composição das fibras musculares em ratas ovariectomizadas e ainda que o tratamento com anti-andrógenos melhorou a sensibilidade à insulina em mulheres hiperandrogênicas (LAI *et al.*, 2016).

Uma das manifestações cutâneas da hiperinsulinemia, que pode ser encontrada na SOP, é a *acantose nigricans*, caracterizada clinicamente por placas aveludadas, hiperpigmentadas, predominantemente no pescoço, axila e virilha. A sua etiologia está

associada aos altos níveis de insulina que se ligam aos receptores IGF-I e estimulam a proliferação de queratinócitos epidérmicos e fibroblastos dérmicos (DIAMANTI-KANDARAKIS & DUNAIF, 2012; HOUSMAN & REYNOLDS, 2014).

Cerca de 50-70% das mulheres com SOP apresentam RI (SIRMANS & PATE, 2013). Além disso, as portadoras da síndrome apresentam prevalência significativamente superior de intolerância à glicose e DM2 quando comparadas às mulheres hígdas (DE MENDONÇA-LOUZEIRO *et al.*, 2015), prevalência que já é observada desde a adolescência nas mulheres com SOP (ROE & DOKRAS, 2011). Uma metanálise realizada por Moran e colaboradores ressalta que a resistência periférica à insulina, hipersecreção de insulina e aumento na função das células β , além de adiposidade abdominal e histórico familiar de diabetes são os principais mecanismos associados ao desenvolvimento de DM2 em mulheres com SOP (MORAN *et al.*, 2010).

3.5 Obesidade e dislipidemia na SOP

A obesidade é definida pelo armazenamento lipídico anormal ou excessivo, sendo caracterizada pelo aumento do número e do volume dos adipócitos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera obeso o indivíduo com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 Kg/m² (CHEN *et al.*, 2013).

A obesidade está largamente associada com a SOP, presente em cerca de 30-70% das portadoras (ALTIERI *et al.*, 2013; DAY *et al.*, 2015). Uma das características marcantes na obesidade das mulheres com a SOP é o acúmulo de gordura visceral, que está relacionado com RI e hiperinsulinemia (LIM *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013). Mulheres obesas podem sofrer alterações no seu potencial reprodutivo, como ovulação prejudicada, irregularidades nos ciclos menstruais e elevada taxa de abortos (ALTIERI *et al.*, 2013). A obesidade pode ainda agravar os transtornos psicológicos como depressão e ansiedade, impactando na qualidade de vida das mulheres (LIM *et al.*, 2012; DOKRAS *et al.*, 2016).

A patogênese da RI, diabetes e aterosclerose conta também com a participação do tecido adiposo, que produz uma diversidade de citocinas e possui função endócrina e metabólica (MUSI & GUARDADO-MENDOZA, 2014).

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grande problema de saúde pública e estão intimamente associadas à obesidade. Mulheres com SOP apresentam elevado risco de desenvolver DCV e esse risco é ainda maior nas mulheres obesas (BALDANI

et al., 2015). O índice de massa corporal (IMC) é o indicador mais comum de obesidade, porém, ele avalia a obesidade de forma generalizada, não sendo capaz de analisar a distribuição da gordura corporal nem de fazer distinção da massa magra. O índice *Lipid Accumulation Product* (LAP), que utiliza a circunferência abdominal (CA) e a concentração sérica de triglicérides (TG), pode ser utilizado para determinar o risco cardiovascular e a RI em mulheres com SOP (NASCIMENTO *et al.*, 2015). O cálculo se dá através da fórmula proposta por *Henry Kahn*:

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

Resultados acima de 34,5 refletem a presença de maior risco cardiovascular e de RI. Elevados índices de LAP estão associados ao aumento da mortalidade por eventos cardíacos e DM2 (KAHN, 2005; WILTGEN *et al.*, 2009).

O índice LAP é, portanto, uma ferramenta útil na identificação de indivíduos possivelmente susceptíveis ao desenvolvimento de DCV e outros prejuízos relacionados com a RI. O trabalho realizado por Malavazos e colaboradores sugere que as mulheres com SOP e índice LAP acima do *cut off* apresentam as maiores alterações nos níveis de marcadores de DCV, como proteína C reativa, IMC, circunferência abdominal, colesterol total e triglicérides. (MALAVAZOS *et al.*, 2015).

Outra alteração metabólica muito comum na SOP é a dislipidemia, com níveis elevados de colesterol total (CT), triglicérides (TG), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de níveis diminuídos da lipoproteína de alta densidade (HDL) (BALDANI *et al.*, 2015; SUR & CHAKRAVORTY, 2016). As mulheres com a síndrome apresentam maior probabilidade de desenvolver a dislipidemia, a qual predispõe ao aumento da injúria endotelial e eleva o risco do desenvolvimento de DCV (SHAN *et al.*, 2013; SUR & CHAKRAVORTY, 2016).

A insulina é também um importante regulador de diversas enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. Assim, a RI pode estar envolvida nos mecanismos da dislipidemia observada na SOP, contribuindo para o aumento da secreção de VLDL pelo fígado e para a redução da sua eliminação, o que, conseqüentemente, favorecerá a produção de TG, além de contribuir também para a redução nos níveis de HDL (BALDANI *et al.*, 2015).

3.6 Diagnóstico da SOP

Apesar de ainda não haver um consenso a respeito do diagnóstico da SOP, os estudos acerca desse tema vêm se desenvolvendo há vários anos. Em 1935, os médicos *Irving Stein* e *Michael Leventhal*, no estudo intitulado “*Amenorrhea associated with polycystic ovaries*”, definiram a tríade clínica que representa a SOP e que serviria, posteriormente, como base para outros estudos (AZZIZ & ADASHI *et al.*, 2016).

No ano de 1990, o *National Institute of Health* (NIH) realizou um encontro internacional no qual foi recomendado que os critérios de diagnóstico da SOP deveriam compreender a presença concomitante de anovulação e evidências de hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo, com exclusão de outras doenças endócrinas semelhantes, mas sem referências a morfologia ovariana (CONWAY *et al.*, 2014).

A *American Society for Reproductive Medicine* e *The European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE/ASRM), no ano de 2003, realizaram um *workshop* em Rotterdam, Holanda, e estabeleceram um novo critério para o diagnóstico da SOP. Além da exclusão de outras doenças, devem estar presentes para o diagnóstico pelo menos dois dos três critérios a seguir: (I) Oligovulação ou anovulação, onde respectivamente, a menstruação ocorre menos de uma vez a cada 35 dias ou ausência da menstruação por no mínimo seis meses; (II) hiperandrogenismo bioquímico (níveis elevados de testosterona total e androstenediona, bem como elevação nos índices de andrógenos livres) ou hiperandrogenismo clínico, evidenciado pelo hirsutismo e (III) presença de ovários policísticos visualizados através de ultrassonografia (12 ou mais folículos medindo de 2 a 9 mm de diâmetro e/ou aumento no volume total do ovário) (FAUSER *et al.*, 2004; HOMBURG, 2008; WELT & CARMINA, 2013).

Em 2006, a *Androgen Excess Society* (AES) publicou uma declaração sugerindo um acordo entre os dois grupos de critérios de diagnóstico, argumentando que a SOP é principalmente um distúrbio hiperandrogênico e que a presença de hirsutismo/acne e/ou hiperandrogenemia constituem elementos essenciais para o diagnóstico. O segundo critério chave para o diagnóstico, de acordo com a AES, poderia ser tanto anovulação, quanto a morfologia ovariana policística (CONWAY *et al.*, 2014).

Além da ultrassonografia, são recomendados vários testes laboratoriais que auxiliam no diagnóstico diferencial da SOP, como dosagens hormonais e perfil lipídico. Os testes incluem dosagens de TSH, prolactina, 17OH-progesterona, testosterona livre e total, DHEAS, globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG), insulina, colesterol total e frações, além de estímulo de GnRH e de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (GOODARZI *et al.*, 2011; LEGRO *et al.*, 2013; ROSENFELD & EHRMANN, 2016).

3.7 Hemostasia

A hemostasia é definida pelo processo através do qual o organismo é capaz de manter a fluidez do sangue, remover os coágulos após qualquer injúria da integridade vascular e restaurar os vasos sanguíneos (VERSTEEG *et al.*, 2013). Esse sistema depende de complexas interações entre vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas procoagulantes e anticoagulantes, além do sistema fibrinolítico (VINE, 2009).

3.7.1 Coagulação

A clássica cascata de coagulação foi introduzida em 1964 por dois grupos independentes. De acordo com esse modelo, a coagulação se dá por meio de ativação sequencial de pró-enzimas, resultando na formação de trombina, responsável por converter a molécula de fibrinogênio em fibrina (VINE, 2009). O processo de coagulação, nessa descrição, é dividido em duas vias, uma extrínseca (envolve elementos que rotineiramente não são encontrados no espaço intravascular) e uma intrínseca (iniciada por componentes intravasculares), que convergem para uma via comum responsável pela geração de trombina suficiente para a conversão do fibrinogênio em coágulo de fibrina (MERCER & CHAMBERS, 2013).

Apesar de a ideia de “cascata” da coagulação representar um grande avanço na compreensão desse processo, esse modelo é atualmente considerado inadequado do ponto de vista fisiológico, uma vez que a divisão das vias não acontece *in vivo* (HOFFMAN & MONROE, 2007).

Diante disso, alterações conceituais foram propostas e chegou-se a um modelo baseado em superfícies celulares para a hemostasia que substitui o modelo clássico de cascata da coagulação. De acordo com o novo modelo, o processo de coagulação

acontece em três fases distintas: iniciação, amplificação e propagação (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Fase de iniciação

A fase de iniciação, classicamente associada à via extrínseca da coagulação, tem início quando, no sítio da lesão, as células que expressam em sua superfície o fator tissular (FT) entram em contato com os componentes do sangue. O FT é uma proteína de membrana que atua como receptor para o fator (F) VII da coagulação. A ligação do FT ao FVII torna-o ativado (a), formando o complexo FVIIa/FT. Em humanos, cerca de 1% da concentração total de FVII está presente na circulação de forma fisiologicamente ativada. O complexo FVIIa/FT apresenta função enzimática ativa, sendo responsável por ativar pequenas quantidades de FIX e FX (HOFFMAN, 2004; TANAKA *et al.*, 2009). O FXa associa-se ao seu cofator, o FVa, para formar na superfície da célula que expressa FT, o complexo denominado protrombinase. Quantidades mínimas de protrombina (fator II) são transformadas em trombina a partir do complexo protrombinase, e uma vez formada, essa trombina pode promover a ativação do FV em FVa. Essa quantidade de trombina não é suficiente para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, porém é de crucial importância na fase de amplificação da coagulação (FRANCO, 2001; HOFFMAN & MONROE, 2007; MCMICHAEL, 2012).

Fatores da coagulação, como a protrombina, o FVII e o FX deixam o espaço vascular, migram através dos tecidos e são encontrados na linfa. Essas evidências sugerem que as reações responsáveis pela iniciação da coagulação ocorrem continuamente no espaço extravascular, e desse modo, pode-se dizer que há uma pequena atividade da via do FT e que pequenas quantidades de trombina são produzidas constantemente nesse espaço. É importante ressaltar que somente em caso de dano vascular, o processo de coagulação segue para a fase de amplificação, permitindo o contato das plaquetas e do FVIII (ligado ao fator von Willebrand) com o tecido extravascular onde se aderem às células que expressam FT (HOFFMAN, 2004; FERREIRA *et al.*, 2010).

Fase de amplificação

As plaquetas e o FVIII ligado ao fator von Willebrand (FVIII/FvW) são normalmente incapazes de deixar o sistema vascular em decorrência do seu grande tamanho, portanto essa passagem acontece apenas quando ocorre lesão vascular (TANAKA *et al.*; 2009). O tampão plaquetário é responsável pela chamada hemostasia primária. Ele é formado quando as plaquetas escapam do espaço vascular e se ligam ao colágeno e a outros componentes da matriz extracelular no sítio da lesão, para se tornarem parcialmente ativadas (FERREIRA *et al.*, 2010). O sistema de coagulação se torna mais efetivo quando a pequena quantidade de trombina produzida pelas células que expressam FT interage com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW. Essa interação induz a ativação máxima de plaquetas e culmina na formação de fibrina estável, consolidando o tampão plaquetário inicial, resultando na hemostasia secundária. As plaquetas ativadas liberam substâncias quimiotáticas que atraem os fatores da coagulação para sua superfície e liberam também FV parcialmente ativado (HOFFMAN, 2003; VINE, 2009).

A trombina gerada na fase de iniciação é ainda responsável por: ativação de FV, ativação de FVIII, dissociação do complexo FVIII/FvW e ativação do FXI. Esses fatores são atraídos por mecanismos quimiotáticos para a superfície das plaquetas, onde rapidamente se inicia a fase de propagação (HOFFMAN & MONROE, 2007; MCMICHAEL, 2012).

Fase de propagação

A fase de propagação é caracterizada pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas. A formação do complexo tenase se dá através da ligação do FIXa, produzido durante a fase de iniciação (que pode também ser produzido pelo FXIa ligado às plaquetas), ao FVIIIa na superfície das plaquetas. Uma vez formado, o complexo tenase ativa o FX a FXa, o qual imediatamente se associa ao FVa para formar o complexo protrombinase, responsável por converter grande quantidade de protrombina em trombina (HOFFMAN, 2003). A trombina gerada tem a função de clivar o fibrinogênio em monômeros de fibrina que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (HOFFMAN, 2004; FERREIRA *et al.*, 2010; VERSTEEG *et al.*, 2013).

A **Figura 1** representa o modelo da coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Para evitar ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão trombótica do vaso, é necessário que haja um rígido controle dos mecanismos de coagulação. Para isso, a atividade das proteases operantes na ativação da coagulação é regulada por numerosas proteínas inibitórias que atuam como anticoagulantes naturais. Dentre elas as que apresentam maior relevância biológica são: o inibidor da via do fator tissular (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT) (MERCER & CHAMBERS, 2013).

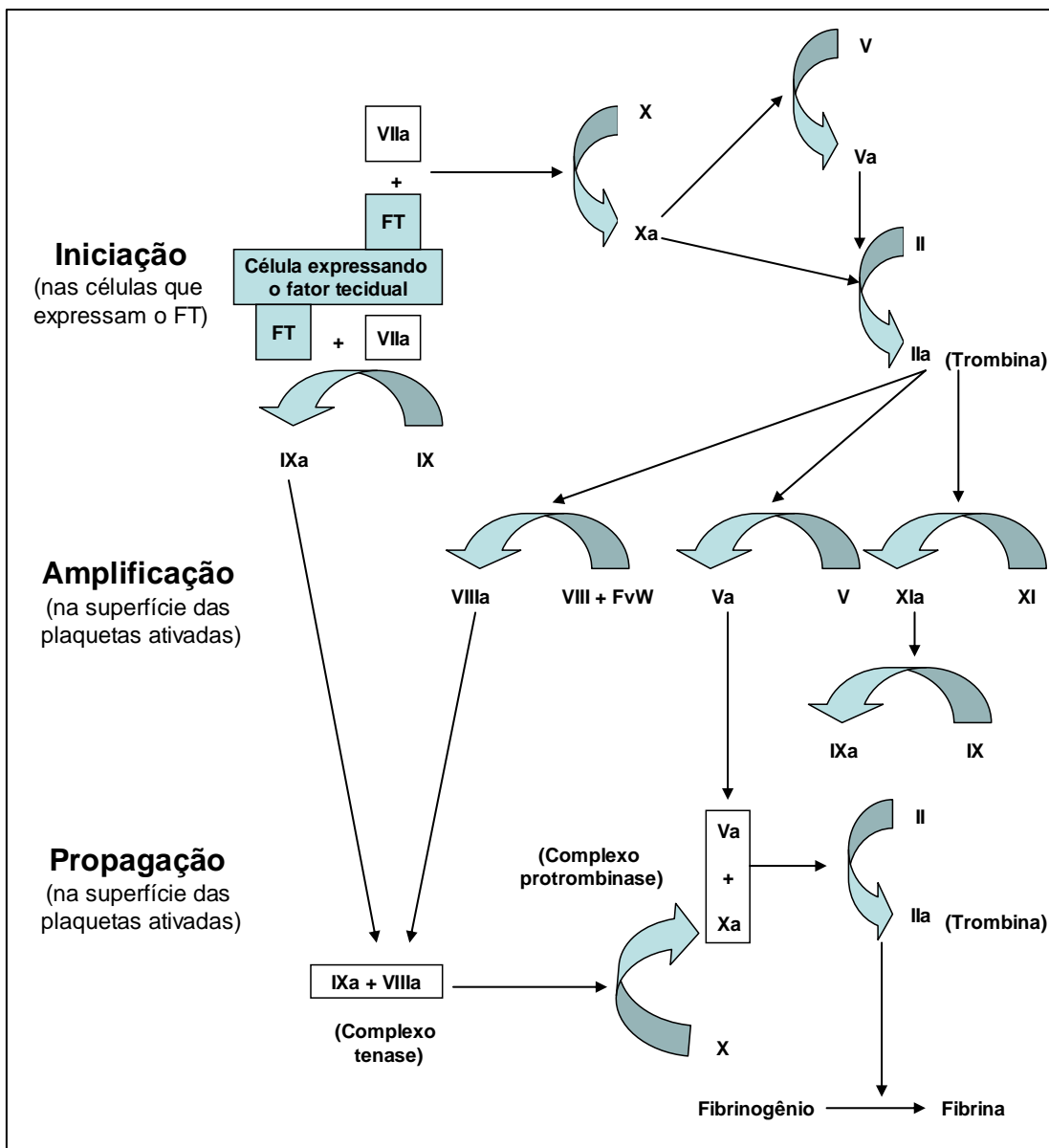


Figura 1 – Representação do modelo de coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tissular (FT), ativado (a); Fator von Willebrand (FvW) (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2010).

3.7.2 Fibrinólise

Para que ocorra a restauração do fluxo sanguíneo do vaso lesionado, é necessário que o trombo formado durante o processo de coagulação seja removido. A fibrinólise pode ser definida como o mecanismo de degradação da fibrina mediado pela plasmina. A plasmina é uma enzima ativa produzida a partir de uma proenzima inativa, o plasminogênio. O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas que regulam a produção de plasmina (FRANCO, 2001; THELWELL, 2010).

O plasminogênio, sintetizado no fígado, possui dois diferentes ativadores fisiológicos: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA “*tissue-type plasminogen activator*”) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA “*uroquinase-type plasminogen activator*”). O t-PA é o principal ativador do plasminogênio na vasculatura, ao passo que o u-PA é o principal ativador no tecido extravascular. O t-PA é secretado pelas células endoteliais em resposta à diversos fatores, incluindo o fator de ativação de plaquetas, porém apresenta baixa afinidade na ausência de fibrina. O u-PA, secretado por células como fibroblastos, células epiteliais, ao contrário do t-PA, pode ativar o plasminogênio na ausência de fibrina (MCMICHAEL, 2012; MERCER & CHAMBERS, 2013).

Após a conversão do plasminogênio, a plasmina degrada o coágulo insolúvel de fibrina em pequenos fragmentos solúveis, os chamados produtos de degradação da fibrina (PDF), dentre os quais, o principal é o dímero-D (D-Di), único fragmento que deriva exclusivamente da fibrina, considerado um importante marcador de hipercoagulabilidade (CRAEN, 2012; DRAXLER & MEDCALF, 2015).

A atividade do sistema fibrinolítico pode ser controlada, em nível da plasmina, pela α 2-antiplasmina (α 2-AP); em nível da ativação do plasminogênio, pelos inibidores da ativação do plasminogênio (PAI-1, PAI-2 e PAI-3); ou ainda de forma indireta pelo inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) (TANAKA *et al.*, 2009; DRAXLER & MEDCALF, 2015). A **Figura 2** ilustra o funcionamento do sistema fibrinolítico.

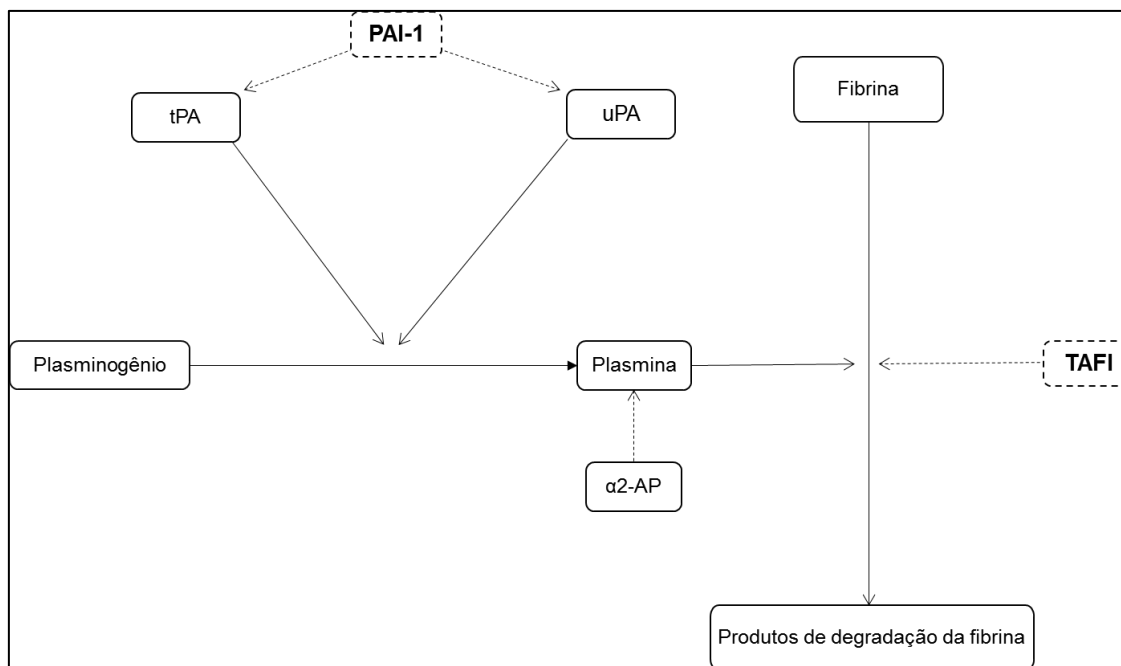


Figura 2 – Representação esquemática da degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico. PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio; tPA: ativador tecidual do plasminogênio; uPA: ativador do plasminogênio do tipo uroquinase; α 2-AP: alpha 2 anti-plasmina; TAFI: inibidor da fibrinólise ativado pela trombina. As setas contínuas representam ativação, enquanto as setas pontilhadas indicam inibição da via (THELWELL, 2010).

3.8 Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)

O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), descoberto há pouco mais de duas décadas, é um importante regulador de equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise. Ele também é conhecido como procarboxipeptidase B2, pró-carboxipeptidase U e procarboxipeptidase R. O TAFI é um zimogênio plasmático sintetizado principalmente no fígado, que circula no plasma como uma proenzima (LONGSTAFF & KOLEV, 2015; PLUG & MEIJERS, 2015).

Durante o processo de coagulação *in vivo*, a ativação da proenzima TAFI de 56 kDa para TAFI ativado (TAFIa), de 36 kDa, pelo complexo trombina-trombomodulina, promove a liberação de um peptídeo de ativação de 20 kDa (TAFI-AP) do domínio catalítico. Subsequentemente, o TAFIa é inativado através de uma mudança de conformação para a forma inativa (TAFIai), seguida de uma clivagem proteolítica, resultando em fragmentos de 25 kDa e 11 kDa (BOFFA *et al.*, 2008).

O TAFI pode ser ativado pela trombina, plasmina ou pelo complexo trombina-trombomodulina. Quando é exposto a um coágulo de fibrina, o TAFIa remove resíduos

de lisina carboxi-terminal da molécula de fibrina, diminuindo assim, sua capacidade de cofator para ativação do plasminogênio, resultando na diminuição da produção de plasmina, o que favorece a manutenção do coágulo de fibrina. A ativação do TAFI pelo complexo trombina-trombomodulina o torna um ponto de conexão entre os sistemas de coagulação e fibrinólise (FAWZY *et al.*, 2015), como mostrado na **Figura 3**.

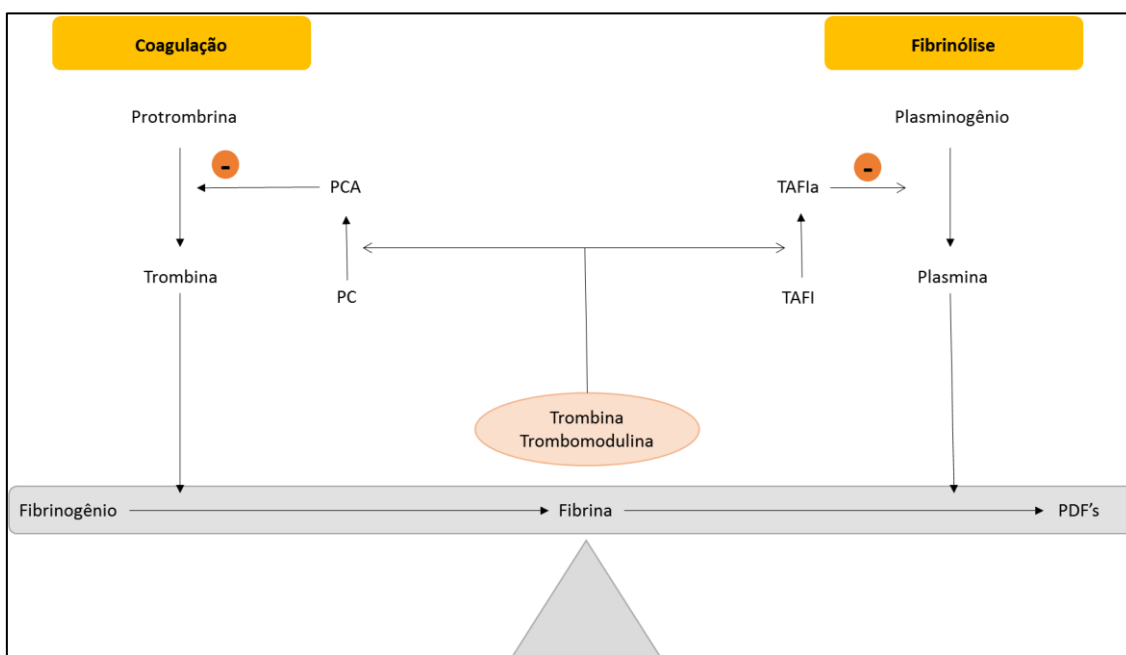


Figura 3 - Ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina (NESHEIM, 2003).

O TAFI é codificado pelo gene *CPB2*, que está localizado no cromossomo 13 (13q14.11) e contém 11 éxons, abrangendo aproximadamente 48 kb. Diversos estudos têm relatado diferentes polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene do *TAFI*, e forte correlação desses polimorfismos com os níveis plasmáticos de TAFI tem sido apresentada (TOKGOZ *et al.*, 2013; FAWZY *et al.*, 2015). Os SNPs podem ser identificados na região 5' flanqueadora, na região codificadora e na região 3'-UTR, sendo que muitos destes polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação (GARAND *et al.*, 2013; FAWZY *et al.*, 2015). Substituições de aminoácidos na proteína do TAFI desempenham um importante papel na determinação dos seus níveis plasmáticos, influenciando sua síntese e secreção ou alterando sua meia-vida no plasma (BOFFA *et al.*, 2008; TÀSSIES *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2016).

A **Figura 4** apresenta alguns dos polimorfismos do gene do TAFI e sua localização (GONZÁLEZ, *et al.*, 2010).

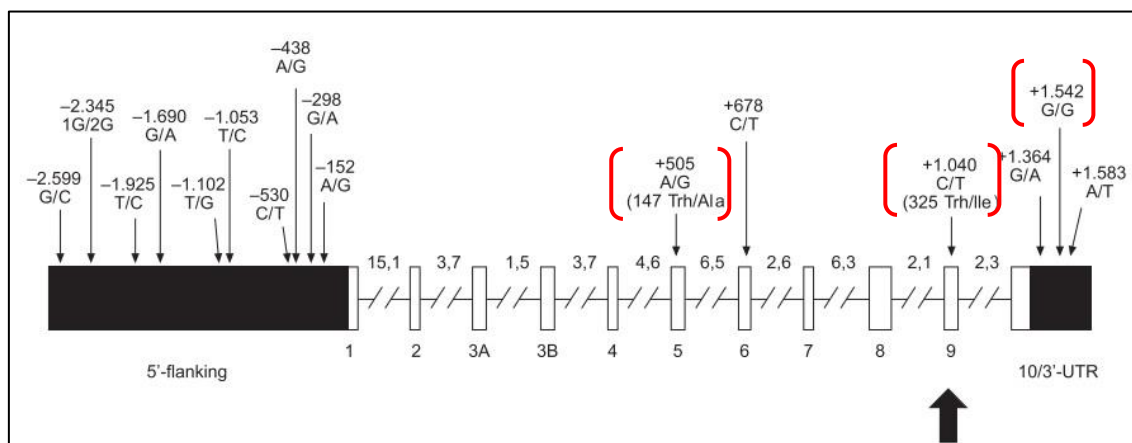


Figura 4 – Gene do *TAFI* e seus polimorfismos já descritos (adaptada de GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Os polimorfismos 505A>G (rs3742264) e 1040C>T (rs1926447), situados na região codificadora, resultam, respectivamente, nas substituições Ala147Thr e Thr325Ile e são os mais frequentes no gene *CPB2*. A literatura acerca dos efeitos destes polimorfismos nos níveis plasmáticos de TAFI é controversa e apresenta associação dos mesmos tanto à níveis e atividade mais elevados (NESHEM, 2003; WANG *et al.*, 2016), quanto à menores níveis desta proteína (BROUWERS *et al.*, 2003; TÀSSIES *et al.*, 2009).

Já o polimorfismo 1542C>G (rs940), localizado na região 3'-UTR, é responsável pela troca de uma Citosina por uma Guanina que pode afetar a instabilidade do mRNA, levando a menores níveis plasmáticos de TAFI (BOFFA *et al.*, 2008).

É extensamente relatada na literatura a relação entre os polimorfismos do TAFI e seus elevados níveis plasmáticos, além do aumentado risco de desenvolver doenças trombóticas em decorrência do aumento da atividade antifibrinolítica. São listadas, dentre outras, doenças como trombose venosa cerebral, doença arterial coronariana, trombose venosa profunda, acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio (OWCZAREK *et al.*, 2012; FAWZY *et al.*, 2015; QIAN *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015). O trabalho realizado por Santos e colaboradores, mostra elevados níveis de TAFI em indivíduos dislipidêmicos além de associação dos polimorfismos rs1926447 e rs3742264 à dislipidemia (SANTOS *et al.*, 2014).

O estudo realizado por Güldas e colaboradores apresenta níveis plasmáticos de TAFI mais elevados em mulheres com SOP quando comparados ao grupo controle hígido (GLDA *et al.*, 2015).

Em recente metanlise, com o objetivo de avaliar a relação entre os polimorfismos +505A/G e 1040C>T no gene do *TAFI* e doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, Wang e colaboradores confirmaram a existência dessa relação sugerindo o efeito desses polimorfismos na susceptibilidade a essas doenças (WANG *et al.*, 2016).

Ensaio clínicos também tem investigado a possível relação entre TAFI e eventos cardiovasculares. Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis de TAFI e risco de doença arterial coronariana (TREGOUET *et al.*, 2009), trombose venosa, ataque isqumico (TOKGOZ *et al.*, 2013), angina de peito e trombose arterial (BROUWERS *et al.*, 2003). Em mulheres no período pós menopausa, foram encontrados níveis elevados de antígeno TAFI, enfatizando, dessa forma, as influências hormonais no controle de seus níveis circulantes (POST *et al.*, 2002).

3.9 Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)  um membro da família dos inibidores de serina proteases (SERPIN) e um dos reguladores primários do sistema fibrinolítico *in vivo*. Ele inibe os ativadores tipo tecidual e uroquinase do plasminogênio, o que conseqüentemente resulta em redução da produção da plasmina e da dissolução dos coágulos de fibrina (LIU *et al.*, 2014).

O gene do *PAI-1*, *SERPINE1*, está localizado no cromossomo 7 (7q21.3-q22), contendo 8 íntrons e 9 éxons. Vários polimorfismos no gene do *PAI-1* têm mostrado influência nos seus níveis plasmáticos. São destacados dois principais polimorfismos, o SNP -844>G (rs2227631) e uma mutação de inserção/deleção -675 4G/5G (rs1799889), ambos na região promotora (DE LA CRUZ-MOSSO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015). O gene do *PAI-1* e seus principais polimorfismos estão representados na

Figura 5.

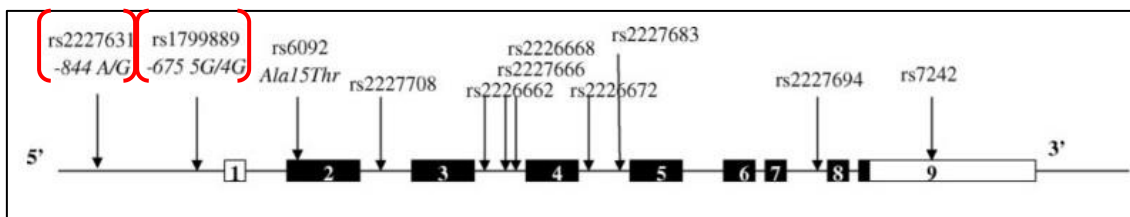


Figura 5 - Gene do *PAI-1* e seus principais polimorfismos já descritos. (Imagem adaptada de MORANGE *et al.*, 2007).

De acordo com Salazar Garcia e colaboradores, mulheres com o genótipo 4G/4G do polimorfismo rs1799889 apresentam risco aumentado para abortos espontâneos e falhas de implantação do embrião. Tal polimorfismo desempenha importante papel nessas condições, provocando alterações em perfis metabólicos, hormonais e imunológicos (GARCIA *et al.*, 2016).

A associação entre os níveis elevados de PAI-1 com eventos cardiovasculares, risco aumentado de aterotrombose, bem como seu uso como preditor de recorrência de infarto agudo do miocárdio, tem sido evidenciada em diversos estudos (ASO *et al.*, 2005; KARÁSEK *et al.*, 2009; EREM *et al.*, 2010).

Elevados níveis de PAI-1 têm sido descritos também em indivíduos idosos. O processo de envelhecimento é responsável por prejuízo progressivo no sistema fibrinolítico, além disso, é acompanhado por diversas modificações no organismo que favorecem a síntese de PAI-1, como o estado inflamatório, obesidade, sarcopenia, entre outros (CESARI *et al.*, 2010).

Além disso, existem alguns estudos evidenciando elevados níveis de PAI-1 em mulheres com SOP, independentemente do seu estado metabólico (GONZÁLEZ *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; CASSAR *et al.*, 2015).

3.10 SOP e alterações hemostáticas

Distúrbios na coagulação e fibrinólise desempenham importante papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Diversas pesquisas com mulheres portadoras da SOP demonstraram desregulação no sistema hemostático e, conseqüentemente, risco aumentado de eventos cardiovasculares (CONWAY *et al.*, 2014; ROSENFELD & EHRMANN, 2016; SUR & CHAKRAVORTY, 2016).

O aumento do risco cardiovascular é esperado nessas mulheres devido à associação aos vários fatores de risco, incluindo resistência à insulina, intolerância à glicose,

diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, entre outros. Além desses fatores, já foi demonstrado que mulheres com SOP apresentam níveis elevados do PAI-1 e de TAFI, o que compromete a sua capacidade fibrinolítica (CASSAR *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015; SUR & CHAKRAVORTY, 2016).

O trabalho desenvolvido por Yildiz e colaboradores para avaliar a capacidade fibrinolítica de mulheres com SOP conclui que estas apresentam prejuízo no processo de fibrinólise que pode contribuir para o aumento do risco cardiovascular (YILDIZ *et al.*, 2002).

Ao avaliar uma população de mulheres com SOP, Manneras-Holm e colaboradores observaram estado protrombótico nessas mulheres com elevados níveis de PAI-1 e fibrinogênio independentemente do IMC, hipertensão e dislipidemia (MANNERAS-HOLM *et al.*, 2011).

Diante do exposto, e das evidências de que os níveis plasmáticos de TAFI e PAI-1 sofrem um controle genético, torna-se pertinente a análise dos níveis destes marcadores de capacidade fibrinolítica, bem como dos polimorfismos em seus genes e sua correlação com os parâmetros metabólicos, hormonais e hemostáticos, com o intuito de melhor compreender as complicações hemostáticas comumente observadas nas mulheres com SOP.

4 Capítulo 1

ASSOCIATION BETWEEN THROMBIN-ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI) AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) WITH BIOCHEMICAL AND HEMOSTATIC PARAMETERS IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME.

Juliane C Albuquerque¹; Natalia MC Luz² T. Thalles HO Ribeiro²; Ana L Candido²; Fernando M Reis²; Franciele S Silva¹; Ieda FO Silva¹; Karina B Gomes¹; Cláudia N Ferreira^{1,3}

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

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author:

Cláudia Natália Ferreira

Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antonio Carlos, 6627 – Pampulha.

Belo Horizonte, Minas Gerais/Brazil

Phone: +55 31 3409-4983

Email: ferreiracn@gmail.com

Abstract

Introduction: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most frequent endocrinopathies among reproductive age women who present hemostatic disorders with damage to the fibrinolytic system, which increases cardiovascular risk events. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) play an important role the fibrinolytic system regulation. This study aimed to investigate TAFI and PAI-1 plasma levels in women with PCOS and to establish the association among TAFI and PAI-1 polymorphisms, other hemostatic, metabolic and hormonal parameters.

Methods: Ninety-seven women with PCOS and ninety-nine healthy women (control) were recruited. Venous blood samples were obtained for biochemical analysis and DNA extraction. The polymorphisms were analyzed using Polymerase Chain Reaction techniques (allele-specific PCR, PCR followed by enzyme restriction - RFLP and real-time PCR).

Results: Patients with PCOS have presented elevated TAFI and PAI-1 levels, as well as higher levels of testosterone, insulin, triglycerides, CT, LDLc and VLDLc and reduced levels of HDLc. TAFI higher levels were observed in genotype GG carriers of rs940 in PCOS group as well in the total participants. Women with PCOS carrying AA genotype of rs2227631 PAI-1 gene polymorphism have presented higher levels of this protein compared to the control group. The multivariate logistic regression model showed an independent association of TAFI, testosterone and abdominal circumference with PCOS.

Conclusion: This study has shown the TAFI and PAI-1 polymorphisms influence on plasma levels in PCOS and healthy women, as well as the association of TAFI, testosterone and abdominal circumference with the syndrome.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, TAFI, PAI-1, hypofibrinolysis, polymorphisms.

Abbreviations: **PCOS** - polycystic ovary syndrome; **TAFI** - thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; **PAI-1** - plasminogen activator inhibitor type-1; **PCR** - polymerase chain reaction; **CPB2** - carboxypeptidase B2; **CVD** - cardiovascular diseases; **TC** - total cholesterol; **HDLc** - high density lipoprotein cholesterol; **LDLc** - low density lipoprotein cholesterol; **VLDLc** - very low density lipoprotein; **TG** - triglycerides; **RFLP**

- restriction fragment length polymorphism; **HWE** - Hardy-Weinberg equilibrium; **BMI** - body mass index; **WC** - waist circumference; **LAP** - lipid accumulation product; **HOMA-IR** - Homeostatic Model Assessment for Insulin resistance; **D-di** – D-dimer; **SNPs** - single nucleotide polymorphisms; **IR** - insulin resistance.

1. Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders, affecting 7-15% of women in reproductive age [1, 2, 3]. Hyperandrogenism, ovulatory disturbances, and polycystic ovarian morphology are typical characteristics of this syndrome that can lead to reproductive and metabolic abnormalities and symptoms of depression and anxiety [2]. The specific pathophysiology of this syndrome has not been established yet. Insulin resistance with compensatory hyperinsulinemia, is an important metabolic disorder in PCOS with high risk of glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus [4]. Additionally, PCOS patients can present high risk for cerebrovascular morbidity, coronary artery disease and dyslipidemia [3]. Women with PCOS also present coagulation and fibrinolysis disturbances including prothrombotic state characterized by hypercoagulability and hypofibrinolysis [5, 6].

Coagulation and fibrinolysis disturbances play a key role in the development of cardiovascular diseases (CVD). Previous studies have demonstrated that women with PCOS present defects in the hemostatic system, and consequently high cardiovascular risk [19, 20, 21] due to insulin resistance, glucose intolerance, type 2 diabetes mellitus, and dyslipidemia [22, 21, 23]. Furthermore, elevated circulating TAFI [24, 25] and PAI-1 levels [7, 8] have been reported in women with PCOS, which compromises her fibrinolytic potential. Ample evidence suggests the association between impaired fibrinolysis and myocardial infarction [9], in addition, several polymorphisms of TAFI and PAI-1 gene have been described associated with the levels of the respective antigens, thus suggesting that the plasma levels of fibrinolysis markers would have significant genetic regulation [10, 26, 27, 28].

Several studies have investigated the important role of Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in fibrinolysis regulation [7, 8, 9, 10]. TAFI is encoded by the carboxypeptidase B2 (CPB2) gene, which is located on chromosomal locus 13q14.11, comprises 11 exons, and spans approximately 48 kb [11]. Its plasmatic activated form (TAFIa) can inhibit fibrinolysis by removing carboxyterminal lysine residues from partially degraded fibrin, decreasing plasminogen binding on its surface [12]. Some polymorphisms in TAFI gene have been identified, as the presence of the isoleucine aminoacid instead of threonine at 325

position, corresponding to the Thr325Ile polymorphism or 1040 C>T (rs1926447). The presence of isoleucine leads to a protein twice more stable and 60% more potent as an antifibrinolytic [13]. The presence of threonine at the Ala147Thr polymorphism or 505 G>A (rs3742264) is associated to lower levels of TAFI [14]. Moreover, the exchange of a C to G at 1542G>C (rs940) polymorphism in the 3'-UTR region affects the stability of the TAFI mRNA, leading to lower protein levels [15].

PAI-1 is a key regulator of fibrinolysis and inhibits the activation of plasminogen to plasmin by both the tissue-type and the urokinase-type plasminogen activators. PAI-1 gene (SERPINE 1) is part of the serpine superfamily located on chromosome 7 (7q21.3-q22.1) and contains eight introns and nine exons [16]. Several polymorphisms in PAI-1 gene have been identified and related to variation in plasmatic PAI-1 levels. A single nucleotide 4G/5G insertion/deletion polymorphism (rs1799768) is located at position -675 in the promoter sequence and the 4G allele is associated with elevated PAI-1 levels [17]. In other another polymorphism, the nucleotide substitution of guanine for adenine in the -844 position affects SERPINE1 expression, which the A allele is associated with increased PAI-1 mRNA and protein levels [18].

The mechanisms of potential disturbances of the hemostatic system in women with PCOS are unknown. Few studies investigating certain hemostatic parameters in PCOS have been conducted. To date, there are no previous studies investigating a large number of hemostatic parameters in PCOS in Brazilian population. This study was conducted in order to investigate the plasma levels of TAFI and PAI-1 and their polymorphisms, as well as to establish the association between these variables and other hemostatic, metabolic and hormonal parameters in women with PCOS.

2. Material and methods

2.1 Subjects

This case-control study included 97 women with PCOS and 99 women without the syndrome (control), both groups aged from 20 to 50 years old. Women with PCOS were recruited at the academic hospital of Federal University of Minas Gerais (UFMG) in Belo Horizonte, Brazil, during the period of 2011-2013. The control group was

recruited from UFMG employees and students in the same period. The study was approved by the Research Ethics Committee of UFMG (CAAE 0379.0.203. 000-11). All participants signed an informed consent form.

The PCOS diagnosis was performed according to the European Society of Human Reproduction/Embryology and the American Society for Reproductive Medicine criteria (ESHRE/ASRM) [29], considering the presence of at least two of three features: 1- oligo / amenorrhea and anovulation; 2- clinical or laboratory hyperandrogenism and 3- ultrasound showing micropolycystic ovaries. The presence of 12 or more follicles in each ovary measuring 2 mm to 9 mm in diameter and/or increased ovarian volume (> 10 mL) were considered micropolycystic ovary.

Exclusion criteria for both groups were: diabetes mellitus, autoimmune, adrenal, kidney and liver diseases, thyroid and thromboembolic disorders, cancer, acute inflammatory disease, hyperprolactinemia, hypogonadism and pregnancy. Subjects, who were being treated with the following medications, were also excluded: steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents, anticoagulant, isotretinoin, cyclosporine, antiretroviral, insulin, metformin and hormonal contraceptives.

2.2 Clinical and laboratorial evaluation

Venous blood samples were obtained after 12 hours of fasting. Serum lipid profile (including evaluation of TC – total cholesterol, HDLc – high density lipoprotein cholesterol, TG – triglycerides, LDLc – low density lipoprotein cholesterol, and VLDLc – very low density lipoprotein) and total testosterone was measured using Vitros ® System (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA). Hemostatic parameters TAFI, PAI-1 and D-dimer were measured by ELISA in citrated blood with the Visulize™ TAFI antigen kit (Affinity Biologicals, Canada), Imunobind Plasma PAI-1 ELISA (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, USA), and Imunoclone D-Dimer ELISA (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, USA), respectively.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (Biopur Extraction Kit Mini Spin Plus — Biometrix ®). Genotyping of TAFI rs940 (1542 G>C) polymorphism and PAI-1 rs1799889 (-675 4G/5G) were performed using allele-specific polymerase

chain reaction [30, 49]. TAFI rs1926447 (Thr325Ile) polymorphism and PAI-1 rs2227631 polymorphism (-844 A>G) were identified by restriction fragment length polymorphism (RFLP) [14, 37]. TAFI rs3742264 (Ala147Thr) polymorphism was detected using the quantitative PCR TaqMan® system in a StepOne equipment (Applied Biosystems®) [32].

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package for Windows, version 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, Illinois, USA). The normal distribution of continuous variables was assessed by the Shapiro-Wilk test. The variables with non-normal distribution were expressed as median and interquartile range and the variables with normal distribution were shown as mean \pm standard deviation. The Student's *t* test was used for parametric variables in order to compare two groups as well as ANOVA was used to compare three groups. The Mann-Whitney test was used to compare two groups for nonparametric variables, while Kruskal-Wallis test followed by the Bonferroni correction was used to compare three groups. Categorical variables were compared between groups by using the chi-square or Fisher's exact test. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was analyzed using an exact test (available at: http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html). Haplotype-based association analysis was performed. We excluded haplotypes whose frequency was less than 1%. The differences in the haplotype frequencies between groups were tested by χ^2 -test ($p < 0.05$).

The multivariate logistic regression was performed primarily as a univariate analysis. We selected those with $p < 0.2$ to compose the multivariate regression analysis. The final model followed the adequacy, according to Hosmer and Lemeshow test. P-values < 0.05 were considered significant.

3 Results

3.1 Characterization of studied groups

A total of 97 women with PCOS and 99 healthy women participated in this study. Clinical and biochemical characteristics of the PCOS and controls are shown in Table

1. BMI, WC, LAP, HOMA-IR, testosterone, TC, LDLc, VLDLc, TG and insulin were significantly higher in PCOS group compared with controls, whereas HDLc was found to be lower in PCOS group ($p < 0.05$). The groups did not differ regarding to age, fasting glucose, CRP and D-dimer.

The hemostatic parameters evaluated in PCOS and control groups are presented in Figure 1. Plasma levels of TAFI and PAI-1 were significantly higher in PCOS patients than in healthy controls.

3.2 Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

Genotype distributions of the polymorphisms did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) (all $p > 0.025$). There was no difference in allelic and genotypic frequency of the polymorphisms rs3742264, rs1926447 and rs940 when compared PCOS and control groups (all $p > 0.05$) (Table 1s). Indeed, a haplotype analysis was conducted for the three polymorphisms excluding those with frequency lower than 1%, but no significant difference was observed between the groups ($p > 0.05$ for all) (Table 2s).

This study assessed the effect of *TAFI* polymorphisms on plasma TAFI levels. When the entire studied population (PCOS and control groups) was evaluated, there were higher levels of TAFI in rs940GG carriers when compared to GC and CC genotypes ($p = 0.010$ and 0.001 , respectively). When the same analysis was performed only for the PCOS group similar results were found, with higher levels of TAFI in rs940GG carriers when compared to GC genotype ($p = 0.032$) (Table 2). No difference in TAFI levels was observed when compared the genotypes regarding rs3742264 and rs1926447 for entire population and PCOS group.

In a second analysis, the genotypes were grouped according to recessive and dominant model of inheritance [GG + GA] x AA or [AA + GA] x GG for the polymorphism rs3742264; [CC + CT] x TT or [TT + CT] x CC for the polymorphism rs1926447, and [CC + GC] x GG or [GG + GC] x CC for the polymorphism rs940. Plasma TAFI levels were higher in GG when compared to CC+GC carriers in the entire population (PCOS + control groups) and PCOS group ($p = 0.001$ and 0.014 , respectively). Moreover,

GG+GC carrier showed higher TAFI levels in entire population when compared to CC carriers ($p=0.006$). No difference was observed in the other polymorphism between the groups (Table 3).

Plasma TAFI levels presents positive and weak correlation with: WC, PAI-1, D-Di, TG and VLDLc; moderate correlation with BMI, insulin, HOMA-IR and LAP. Moreover, there was negatively correlation with HDLc (Figure 2).

3.3 Plasminogen activator inhibitor – 1 (PAI-1)

The PAI-1 polymorphisms rs2227631 and rs1799889 were under Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.025$). Difference in allelic and genotypic frequency between PCOS and control groups was not significant (all $p>0.05$) (Table 3s). Analysis of haplotype frequency showed that no haplotype was associated with PCOS (all $p>0.05$) (Table 4s).

To investigate the possible effects of polymorphisms on PAI-1 plasma levels, the entire population studied was first evaluated, then just the PCOS group. The results of first analysis show that there is no influence of these polymorphisms on PAI-1 plasma levels ($p>0.05$ for all). However, higher levels of PAI-1 in AA genotype of rs2227631 polymorphism when compared to GG and GA carriers was observed only for PCOS group ($p=0.009$ and 0.038 , respectively). No significant difference was observed regarding the PAI-1 plasma levels according to rs1799889 genotypes in PCOS group ($p>0.05$) (Table 4).

Genotypes were gathered according to a recessive and dominant model of inheritance: rs2227631 [AA/GA x GG or GG/GA x AA]; and rs1799889 [4G4G/5G4G x 5G5G or 5G5G/5G4G x 4G4G] in a second analysis. For the entire population, no influence was observed (all $p>0.5$), however, when analysis was directed only to the PCOS group, the results appointed higher plasma levels of PAI-1 in rs2227631AA or GA carriers when compared with GG genotype ($p=0.005$) (Table 5).

Plasma PAI-1 levels were positively correlated with TAFI, CRP, TC, LDLc, VLDLc, TG, fasting glucose, HOMA-IR, insulin, LAP, BMI, and WC. There was a negatively correlation with HDLc (Figure 3).

3.4 Multivariate logistic regression

The model of multivariate logistic regression was adequate according to the Hosmer and Lemeshow test ($p=0.416$). We observed that WC (OR=0.902, $p<0.001$), testosterone (OR=0.968, $p=0.001$), and TAFI levels (OR=0.455, $p<0.001$) were found to be independently associated with PCOS (Table 6).

4 Discussion

This study investigated the association among three *TAFI* polymorphisms with plasma TAFI levels and two *PAI-1* polymorphisms with plasma PAI-1 levels in PCOS patients and in a control group. D-dimer levels were also compared between these groups.

Women with PCOS are prone to high cardiovascular risk, with high frequency of obesity, dyslipidemia, hypertension, diabetes, and several metabolic complications like impaired glucose tolerance and insulin resistance [33, 34]. As expected, our results showed higher rates of LAP, BMI, WC, HOMA-IR, testosterone, insulin, TC, LDLc, VLDLc, TG and lower levels of HDLc in PCOS patients when compared with control group. We also found higher plasma TAFI and PAI-1 levels in PCOS patients.

Our findings can be compared to results of earlier studies that demonstrate elevated levels of TAFI and PAI-1 in PCOS patients and no significant difference in D-dimer levels between these groups [35, 36, 37]. Yildiz et al., in the assessment of the global fibrinolytic capacity of patients with PCOS, found no significant difference in D-dimer values between PCOS and control groups [35]. Adali and colleagues found plasma TAFI levels significantly higher in overweight or obese PCOS patients than in healthy women [36]. Lin and coworkers found higher levels of PAI-1 in women with PCOS than in healthy controls in a Chinese population [37]. The results have shown that TAFI and PAI-1 levels were significantly higher in women with PCOS compared with healthy controls, confirming the impairment in the fibrinolytic capacity of these women.

There was no difference in allelic and genotypic frequency of TAFI polymorphisms rs3742264, rs940 and rs1926447 when compared the two groups, suggesting that

these polymorphisms are not associated with PCOS onset. Zheng et al., found no significant difference in allele and genotype frequencies of rs3742264 polymorphism in patients with macrovascular disease and healthy individuals. In contrast, analysis of the rs1926447 polymorphism revealed a statistically lower percentage of the T allele in the macrovascular disease group than in healthy group [23]. The study by Tokgoz et al., that evaluated TAFI polymorphisms in patients with cerebral venous thrombosis also found no difference in allelic and genotypic distribution between groups. [38]. Tàssies and coworkers showed that rs940GG and rs1926447TT were less frequent in patients with acute coronary syndrome with ST-segment elevation [14]. Our contrasting results could be partially explained by the different population genetic background. Additionally, our results show no relationship between TAFI gene haplotypes and PCOS.

An important association among TAFI levels and their polymorphisms has been demonstrated [30, 41]. SNPs in the 3' UTR region could affect *CPB2* mRNA abundance by influencing the stability of the *CPB2* transcript or polyadenylation site selection resulting in lower TAFI levels [14]. The present study is the first to our knowledge to demonstrate higher TAFI levels in rs940GG carriers in the entire population (PCOS + control groups) and only PCOS, as well as comparative analysis among genotypes on recessive and dominant model of inheritance. The data provide preliminary evidence to suggest the influence of rs940GG genotype on plasma TAFI levels in this population. Many studies in different populations have shown contrary results to our data [30, 14, 39]. In evaluation of a healthy caucasian population, Henry and colleagues found lower TAFI levels in GG genotype carriers in individual analysis of the polymorphisms [30]. A study of Tàssies and colleagues with acute coronary syndrome patients also presents opposite results. They pointed lower plasma TAFI levels in rs940GG carriers [14]. The presence of genotype GG in rs940 was associated with higher risk of thrombotic microangiopathies, however, this genotype presented lower TAFI levels in the Germany population [39]. A plausible reason for this discrepancy might be different pathological condition, since this is the first study that evaluates PCOS.

Although PCOS etiology is not completely understood yet, this syndrome is considered a multifactorial disorder that involves genetics, endocrine, hemostatic and metabolic

abnormalities. Since TAFI plays a key role on fibrinolysis regulation, and has been associated with insulin resistance and other disorders [41], this study investigated the correlation between plasma TAFI levels and hemostatic and biochemical parameters, as well as cardiovascular risk factors in PCOS and control groups. A connection between PCOS and hypofibrinolytic status has been demonstrated in several studies [20, 21, 25]. In the present study, the correlation was shown between plasma TAFI levels and PAI-1 and D-dimer. This finding is partially in agreement with Oral et al, that reports correlation between TAFI and PAI-1 but not D-dimer [40]. It was found a significant correlation between plasma TAFI levels and testosterone levels contradicting data of Güldas et al. that found no correlation between TAFI levels and androgens [41]. Insulin, VLDLc, TG, HOMA-IR, LAP, BMI, and WC are also positively correlated with plasma TAFI levels. Furthermore, correlation between HDLc and TAFI levels was negative. This finding is congruent with studies that evaluated populations of women with PCOS and healthy women [24, 40, 41]. These correlations emphasize the risk of hemostatic and metabolic disorders that can be intensified with high TAFI levels.

There was no significant difference in allelic and genotypic frequency of PAI-1 polymorphisms rs2227631 and rs1799889 in the evaluated groups, which suggests no relationship between these polymorphisms and PCOS development. Studies evaluating case-control populations with different conditions such as coronary heart disease [42, 43] and recurrent abortion [44] have shown similar results for allele and genotype frequencies between the groups. Abboud et al., found a higher frequency of 4G allele of the rs1799889 polymorphism and lower frequency of allele A of the polymorphism rs2227631 in patients with myocardial infarction when compared to the control group [31]. Discrepant findings among studies may be the result of the heterogeneous nature of the population studied. In addition, PAI-1 polymorphisms were not associated with PCOS by haplotype analysis.

Current literature supports the findings that plasma PAI-1 levels are influenced by several polymorphisms in its gene, among them rs1799889 and rs2227631, and its overexpression that leads to a decrease in fibrinolysis, and therefore, increases the risk of thrombotic events [37, 45, 46]. The first polymorphism affects the binding of nuclear proteins involved in the regulation of *PAI-1* gene transcription. Homozygosity

for 4G allele has been associated with increased transcription of the PAI-1 gene. [49]. A nucleotide substitution of guanine for adenine in the -844 position generates a consensus sequence for the ETs nuclear protein (transcription factors that regulate positively or negatively the expression of genes) potentially implicating in the regulation of the *PAI-1* gene [45]. High plasma PAI-1 levels are widely related to rs1799889 polymorphism, especially to 4G allele [37, 47] and to allele A of rs2227631 polymorphism [48, 18]. The present study demonstrated high PAI-1 levels in carriers of rs2227631AA genotype in PCOS group.

Through analysis of the recessive and dominant model of inheritance, we observed higher PAI-1 levels only in PCOS patients rs2227631AA or GA carriers. No difference was found when the entire population was analyzed. Abboud and colleagues found a similar result when assessing the association among rs2227631 and rs1799889 polymorphisms and PAI-1 levels in patients with myocardial infarction. They showed that rs2227631AA carriers presented higher PAI-1 levels when compared with healthy controls. In addition, they indicate an elevated risk of the occurrence of infarction in patients with rs1799889-4G and rs2227631-A [31]. Morange and colleagues pointed rs2227631AA genotype as a risk factor for venous thrombosis in factor V Leiden carriers [49]. Lin et al. observed higher PAI-1 levels in Chinese women with PCOS carrying rs2227631AA [37]. These data enable to highlight the functional role of rs2227631 polymorphism in the regulation of PAI-1 gene expression in women with PCOS.

PAI-1 levels are not influenced just by genetic factors. Metabolic factors also play an important role in plasma PAI-1 concentration [50]. Our analysis showed a correlation between PAI-1 levels with elements that determine adiposity such as BMI, WC and LAP, as well as some characteristics of the metabolic syndrome like insulin, HOMA-IR, fasting glucose, TG, TC, VLDLc, LDLc, and HDLc (negatively). It has also found correlation between PAI-1 and TAFI. Similar correlations were found in different studies [22, 49, 40]. A study evaluating metabolic biomarkers of overweight and lean PCOS patients points to PAI-1 as an insulin resistance predictor in both women with PCOS and healthy women [22]. According to Morange et al., myocardial infarction patients present correlation between PAI-1 levels and insulin levels and BMI [49].

Correlations between PAI-1/TAFI and PAI/HOMA-IR agree with Oral and colleagues, who evaluated hemostatic parameters in PCOS patients on Turkey [40].

The link between inflammation and the fibrinolytic system and the key role of PAI-1 in this binding are broadly described. Experimental *in vivo* studies performed in animal models, as well as in humans, have shown that TNF- α (Tumor necrosis factor) and IL-6 are important contributors to the increases of PAI-1 levels. IL-6 is an acute phase inflammatory reaction protein produced after TNF- α and IL-1 stimulation that induces the synthesis of CRP [50], which is in agreement with this results that showed positive correlation between PAI-1 levels and CRP.

Finally, in a multivariate logistic regression analysis, this study points to abdominal circumference, testosterone and TAFI levels independently associated with PCOS. The association between abdominal circumference and testosterone with PCOS was already expected, since obesity and hyperandrogenism are characteristics of these syndrome, with hyperandrogenism being one of its diagnostic criteria. The association of TAFI attests the impairment of fibrinolytic capacity in PCOS with an increase in the cardiovascular risk for the patients. Several studies about TAFI suggest that increases in TAFI levels contribute to arterial and venous thrombus formation [38]. Furthermore, it is an independent variable in ischemic stroke [52].

5 Conclusion

The small sample analyzed may be considered the present study limitation. Nevertheless, this is the first report to our knowledge indicating higher TAFI levels in rs940GG carriers in both PCOS and control groups in Brazilian women. Our results also showed that plasma TAFI and PAI-1 levels were significantly increased in women with PCOS and that the genotype AA of rs2227631 polymorphism exerts influence on plasma PAI-1 levels of women with PCOS leading to higher levels. The data provide convincing evidence of an independently association of TAFI levels, testosterone and abdominal circumference with PCOS. Further studies should be conducted in order to validate our results in other populations.

6 Acknowledgements

We are grateful to FAPEMIG, CNPq/Brazil, and PRPq/UFMG for the financial support. FMR and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship.

7 Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would cause detriment to the impartiality of this scientific work.

8 Reference

- [1] Azziz R. Introduction: Determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 1, p. 4–5, 2016.
- [2] Kokosar M, Benrick A, Prfilyev A, Fornes R, Nilsson E, Maliqueo M, Behre C, Sazonova A, Ohlsson C, Ling C, Stener-Victorin E. Epigenetic and transcriptional alterations in human adipose tissue of polycystic ovary syndrome. *Scientific Reports*, v. 6, n. February, p. 22883, 2016.
- [3] Lizneva D, Suturina S, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 1, p. 6–15, 2016.
- [4] 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. PCOS Forum: Research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clinical Endocrinology*, v. 74, n. 4, p. 424–433, 2011.
- [5] Vaughan DE. E. PAI-1 antagonists: the promise and the peril. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v. 122, p. 312–25, 2011.
- [6] Shan Y, Wang A, Sun Y, Jiang J, Pang B, Na Z, Du X, Wang W, Huang Z. Coagulation and fibrinolytic indices during the first trimester of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: a preliminary study. *Reproductive Science*, v. 20, n. 11, p. 1390–1397, 2013.
- [7] Craen BVD, Declerck PJ, Gils A. The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis Research*, v. 130, n. 4, p. 576–585, 2012.
- [8] Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *British Journal of Haematology*, v. 157, n. 3, p. 291–298, 2012.
- [9] Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 13, n. C, p. S98–S105, 2015.
- [10] Plug T, Meijers JCM. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 14, n. 4, p. 633–644, 2016.
- [11] Wang SW, Zhang HH, Dong CY, Sun HH. Meta-analysis of TAFI polymorphisms and risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p. 1–13, 2016.
- [12] Bunnage ME, Blagg J, Steele J, Owen DR, Allerton C, McElroy AB, Miller D, Ringer T, Butcher K, Beaumont K, Evans K, GrayAJ, HollandSJ, Feeder N, Moore RS, Brown DG. Discovery of potent & selective inhibitors of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor for the treatment of thrombosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 24, p. 6095 – 6163, 2007.
- [13] NESHEIN M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest Journal*. v. 124, n. 3 suppl, p. 33–39, 2003.
- [14] Tàssies D, Roqué M, Monteagudo J, Martorell T, Sionis A, Arzamendi D, Heras M, Reverter JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome. *Thrombosis Research*, v. 124, n. 5, p. 614–618, 2009.
- [15] Brouwers GJ, Leebeek FWG, Tanck MWT, Jukema JW, Kluft C, Maat MPM. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thrombosis and haemostasis*, v. 90, n. 1, p. 92–100, 2003.

- [16] De La Cruz-Mosso U, Muñoz-Valle JF, Salgado-Goytia L, Garcia-Carrón A, Illades-Aguiar B, Castañeda-Saucedo E, Parra-Rojas I. Relationship of metabolic syndrome and its components with 844 G/A and HindIII C/G PAI-1 gene polymorphisms in Mexican children. *BMC Pediatrics*, v. 12, n. 1, p. 41- 49, 2012.
- [17] GONG LI, PENG JH, HAN FF, ZHU J, FANG LH, WANG YH, DU GH, WANG HY, LIU LH.. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: A meta-analysis. *Thrombosis Research*, v. 130, n. 3, p. e43–e51, 2012.
- [18] Xu X, Wang H, Li H, Cui X, Zhang H. SERPINE1 -844 and -675 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese Han population. *Journal of International Medical Research*, v. 44, n. 6, p. 1292–1301, 2016.
- [19] Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz BO. The polycystic ovary syndrome: A position statement from the European Society of Endocrinology. *European Journal of Endocrinology*, v. 171, n. 4, p. P1–P29, 2014.
- [20] Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Endocrine Reviews*, v. 37 n. 5, p. 467 - 520, 2016.
- [21] Sur D, Chakravorty R. Association of coronary heart disease risk and lipid profile in Indian women with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Gynecology & Obstetrics*. v. 5, n. 1, p. 23–26, 2016.
- [22] Cassar S, Teede HJ, Harrison CL, Johan AE, Moran LJ, Stepto NK. Biomarkers and insulin sensitivity in women with Polycystic Ovary Syndrome: Characteristics and predictive capacity. *Clinical Endocrinology*, v. 83, n. 1, p. 50–58, 2015.
- [23] Zheng C, Li X, Kong C, Ke S, Peng C, Cui T, Gao M, Zhou Y, Guo W, Huang L, Petersen R, Huang H. Effect of single nucleotide polymorphism in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on the risk of diabetic macrovascular disease. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 26, n. 2, p. 185–190, 2015.
- [24] De Mendonça-Louzeiro MR, Annichino-Bizzacchi JM, Magna LA, Quaino SK, Benetti-Pinto CL. Faster thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome compared with healthy controls matched for age and body mass index. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 6, p. 1786–1790, 2013.
- [25] De Mendonça-Louzeiro MR, Annichino-Bizzacchi JM, Benetti-Pinto CL. Android fat distribution affects some hemostatic parameters in women with polycystic ovary syndrome compared with healthy control subjects matched for age and body mass index. *Fertility and Sterility*, v. 104, n. 2, p. 467–473, 2015.
- [26] Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh S, Khatib ZK, Tabibian S, Kazemi A, Dargahi H, Bamedi T. Polymorphism of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and risk of intracranial haemorrhage in factor XIII deficiency. *Haemophilia*, v. 20, n. 1, p. e89 – e92, 2013.
- [27] Liu Y, Sun MG, Jiang R, Ding R, Che Z, ChenYY, Yao CJ, Zhu XX, Cao JY. Plasminogen activator inhibitor-1 -675 4G/5G polymorphism and polycystic ovary syndrome risk: a meta analysis. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*, v. 31, n. 3, p. 363–370, 2014.
- [28] Wang LH, Wang LM, Zhou N. 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with polycystic ovary syndrome in Chinese patients: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. v. 292, n.3, p. 683–686, 2015.
- [29] The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. v.81, n.1, p19–25, 2004.

- [30] Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, Juhan-Vague I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: Evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood*, v. 97, n. 7, p. 2053–2058, 2001.
- [31] Abboud N, Ghazouani L, Saidi S, Bem-Hadj-Khalifa S, Addad F, Almawi WY, Mahjoub T. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphisms and changes in PAI-1 tissue plasminogen activator levels in myocardial infarction: a case-control study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 14, n. 1, p. 23–27, 2010.
- [32] Tregouet DA, Schnabel R, Alessi MC, Godefroy T, Declerk PJ, Nicaud V, Munzel T, Bickel C, Rupprecht HJ, Lubos E, Zeller T, Juhan-Vague I, Blankenberg S, Tiret L, Morange PE. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, v. 7, n. 1, p. 49–57, 2009.
- [33] Nascimento JXPT, Chein MBC, Sousa RML, Ferreira AS, Navarro PA, Brito LMO. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids in Health and Disease*, v. 14, n. 62, p. 1–8, 2015.
- [34] Baldani DP, Skrgatic L, Ougouag R. Polycystic ovary syndrome: important underrecognised cardiometabolic risk factor in reproductive-age women. *International Journal of endocrinology*. v. 2015, p. 1-17, 2015.
- [35] Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.87, n.8, p. 3871–3875, 2002.
- [36] Adali E, Yildizhan R, Kurdoglu M, Bugdayci G, Kolusari A, Sahin HG. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in young obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 2, p. 666–672, 2010.
- [37] Lin S, Huiya Z, Bo L, Wei W, Yongmei G. The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 2844 A/G and 2675 4G/5G promoter polymorphism significantly influences plasma PAI-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, v. 36, n. 3, p. 503 – 509, 2009.
- [38] Tokgoz S, Zamani AG, Durakbasi-Dursun HG, Yilmaz O, Iihan N, Demirel S, Tavli M, Siman A. TAFI gene polymorphisms in patients with cerebral venous thrombosis. *Acta Neurologica Belgica*, v. 113, n. 3, p. 291–297, 2013.
- [39] Sucker C, Hetzel GR, Farokhzad F, Dahhan F, Schmitz M, Kurschat C, Grabensee B, Maruhn-Debowski B, Zotz R, Scharf R. Association of genotypes of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitors with thrombotic microangiopathies—a pilot study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 22, n. 5, p. 1347–1350, 2007.
- [40] Oral B, Mermi B, Dilek M, Alanoglu G, Sütçü R. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 110-116, 2009.
- [41] Güldeş M, Altinkaya SO, Nergiz S, Demircan-Sezer S, Yüksela H. Elevated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, v. 31, n. 7, p. 536–539, 2015.
- [42] Su S, Chen S, Zhao J, Huang J, Wang X, Chen R, Gu D. Plasminogen activator inhibitor-1 gene: selection of tagging single nucleotide polymorphisms and association with coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 26, n. 4, p. 948–954, 2006.

- [43] Koch W, Schremppf M, Eri A, Mueller JC, Hoppmann P, Schömig A, Kastrati A. 4G/5G polymorphism and haplotypes of SERPINE1 in atherosclerotic diseases of coronary arteries. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 103, n. 6, p. 1170–1180, 2010.
- [44] Kim JJ, Choi YM, Lee SK, Yang KM, Paik EC, Jeong HJ, JunJK, Han AR, Hong MA. The PAI-1 4G/5G and ACE I/D polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a case–control study. *American Journal of Reproductive Immunology*. v. 72, n. 6, p. 571-576, 2014.
- [45] García-González IL, Valle Y, Sandoval-Pinto E, Valdéz-Alvarado E, Valdéz-Haro A, Muñoz-Valle JF, Flores-Salinas HE, Figuera-Vellanueva LE, Dávalos-Rodríguez NO, Padilla-Gutiérrez JR. The -844 G>A PAI-1 polymorphism is associated with acute coronary syndrome in Mexican population. *Disease Markers*, v. 2015, n. August, p. 1–7, 2015.
- [46] Verschuur M, Jellema A, Bladbjerg EM, Feskens EJM, Mensink RP, Møller L, Vos HL, Maat MPM. The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter haplotype is related to PAI-1 plasma concentrations in lean individuals. *Atherosclerosis*, v. 181, n. 2, p. 275–284, 2005.
- [47] Garcia MDS, Sung N, Mullenix TM, Dambaeva S, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with reproductive failure: metabolic, hormonal, and immune profiles. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 76, n. 1, p. 70–81, 2016.
- [48] Parpugga TK, Tatarunas V, Skipskis V, Kupstyte N, Zaliaduonyte-Peksiene D, Lesauskaite V. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Disease markers*, v. 2015, n., p. 1–8, 2015.
- [49] Morange PE, Henry M, Tregouet D, Granel B, Aillaud MF, Alessi MC, Juhan-Vague I. The A-844G polymorphism in the PAI-1 gene is associated with a higher risk of venous thrombosis in factor V Leiden carriers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 20, n. 5, p. 1387–1391, 2000.
- [50] Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, n. 5, p. 72–91, 2010.
- [51] Morange PE, Saut N, Alessi MC, Yudkin JS, Margaglione M, Minno GD, Hamsten A, Humphries SE, Tregouet DA, Juhan-Vague I. Association of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with myocardial infarction, plasma PAI-1, and metabolic parameters: The HIFMECH Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 10, p. 2250–2257, 2007.
- [52] LADENVALL C, GILS A, JOOD K, BLOMSTRAND C, DECLERK PJ, JERN C. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 4, p. 955–962, 2007.
- [53] Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences Lawrence Erlbaum Associates. *Hillsdale, NJ*, p. 20–26, 1988.

Table 1 – Clinical and biochemical characteristics of PCOS and control groups

Variable	PCOS (n=94)	Control (n=97)	p
Age (years)	30.6 ± 5.0	29.5 ± 7.1	0.214
BMI (Kg/m²)	29.0 ± 5.2	25.0 ± 4.1	< 0.001*
WC (cm)	96.3 ± 13.2	84.6 ± 12.8	< 0.001*
LAP	57.9 ± 34.2	30.1 ± 22.6	< 0.001*
HOMA-IR	2.6 (3.4)	1.5 (0.9)	< 0.001*
Testosterone (ng/dL)	54.6 ± 38.8	29.1 ± 14.0	< 0.001*
TC (mg/dL)	193.2 ± 37.0	180.7 ± 34.2	0.005*
HDLc (mg/dL)	44.0 (19.0)	53.0 (18.0)	< 0.001*
LDLc (mg/dL)	116.8 ± 32.3	105.7 ± 31.7	< 0.001*
VLDLc (mg/dL)	22.9 (16.0)	17.6 (10.0)	0.006*
TG (mg/dL)	115.0 (78.0)	84.0 (51.0)	0.002*
Fasting glucose (mg/dL)	87.1 ± 9.1	86.9 ± 9.5	0.265
Insulin (uUI/mL)	12.4 (16.8)	7.4 (4.1)	< 0.001*
CRP (mg/dL)	5.0 (8.6)	4.0 (2.0)	0.166
D-Di (µg/mL)	181.3 (180.5)	175.6 (157.3)	0.269

BMI (body mass index), WC (waist circumference), LAP (lipid accumulation product), HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment - Insulin resistance), TC (total cholesterol), HDLc (high density lipoprotein cholesterol), LDLc (low density lipoprotein cholesterol), VLDLc (very low density lipoprotein cholesterol), TG (triglycerides), CRP (C-reactive protein). Normal variables are shown as mean ± Standard Deviation. Non-normal variables are shown as median (Interquartile Range). Student t test for normal variables and Mann-Whitney test for non-normal variables. Significant*: p<0.05.

Table 2 - TAFI levels according to the genotypes of the polymorphisms rs3742264, rs1926447 and rs940

PCOS and control groups				
	Genotypes			p
	GG (n= 67)₍₁₎	GA (n= 76)₍₂₎	AA (n= 17)₍₃₎	
rs3742264 TAFI (µg/mL)	5.6 ± 1.8	6.1 ± 1.6	5.9 ± 1.4	0.320 (a)
	CC (n= 71)₍₁₎	CT (n= 102)₍₂₎	TT (n= 18)₍₃₎	p
	rs1926447 TAFI (µg/mL)	6.2 ± 1.7	5.7 ± 1.5	5.9 ± 2.0
	GG (n= 122)₍₁₎	GC (n= 61)₍₂₎	CC (n= 11)₍₃₎	p
	rs940 TAFI (µg/mL)	6.2 ± 1.6	5.6 ± 1.5	4.6 ± 1.2
PCOS group				
	Genotypes			p
	GG (n= 36)₍₁₎	GA (n= 38)₍₂₎	AA (n= 5)₍₃₎	
rs3742264 TAFI (µg/mL)	6.4 ± 1.9	6.8 ± 1.7	7.2 ± 1.1	0.444 (a)
	CC (n= 37)₍₁₎	CT (n= 45)₍₂₎	TT (n= 12)₍₃₎	p
	rs1926447 TAFI (µg/mL)	7.0 ± 1.7	6.4 ± 1.7	7.0 ± 1.3
	GG (n= 64)₍₁₎	GC (n= 29)₍₂₎	CC (n= 4)₍₃₎	p
	rs940 TAFI (µg/mL)	7.0 ± 1.6	6.2 ± 1.7	5.6 ± 0.4

TAFI levels (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) are shown as mean ± Standard Deviation. (rs3742264): Group 1 – Genotype GG; Group 2 – Genotype GA; Group 3 – Genotype AA. (rs1926447): Group 1 – Genotype CC; Group 2 – Genotype CT; Group 3 – Genotype TT. (rs940): Group 1 – Genotype GG; Group 2 – Genotype GC; Group 3 – Genotype CC. (a) ANOVA test for groups 1, 2 and 3. (b) t Student Test for groups 1 and 2. (c) t Student Test for groups 1 and 3. (d) Test t de Student for groups 2 and 3. Significant*: p<0.05. n = number of individuals in each genotype.

Table 3 – TAFI levels according to recessive and dominant model of inheritance for the polymorphisms rs3742264, rs1926447 and rs940

PCOS and control groups						
rs3742264	GG/GA (n= 143)	AA (n= 17)	p	AA/GA (n= 93)	GG (n= 67)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	5.9 \pm 1.7	5.9 \pm 1.4	0.909	6.1 \pm 1.6	5.5 \pm 1.8	0.056
rs1926447	CC/CT (n= 173)	TT (n= 18)	p	TT/CT (n= 120)	CC (n= 71)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	5.9 \pm 1.6	5.9 \pm 2.0	0.988	5.7 \pm 1.6	6.2 \pm 1.7	0.071
rs940	CC/GC (n= 72)	GG (n= 122)	p	GG/GC (n= 183)	CC (n= 11)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	5.4 \pm 1.5	6.2 \pm 1.6	0.001*	6.0 \pm 1.7	4.6 \pm 1.2	0.006*
PCOS group						
rs3742264	GG/GA (n= 74)	AA (n= 5)	p	AA/GA (n= 43)	GG (n= 36)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	6.6 \pm 1.8	7.2 \pm 1.2	0.502	6.9 \pm 1.6	6.3 \pm 1.9	0.110
rs1926447	CC/CT (n= 82)	TT (n= 12)	p	TT/CT (n= 57)	CC (n= 37)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	6.7 \pm 1.7	7.0 \pm 1.3	0.602	6.5 \pm 1.7	7.0 \pm 1.7	0.161
rs940	CC/GC (n= 33)	GG (n= 64)	p	GG/GC (n= 93)	CC (n= 4)	p
TAFI ($\mu\text{g/mL}$)	6.1 \pm 1.6	7.0 \pm 1.6	0.014*	6.8 \pm 1.7	5.6 \pm 0.5	0.163

TAFI levels (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) are shown as mean \pm Standard Deviation. t Student Test. Significant*: p < 0.05. n = number of individuals in each genotype.

Table 4 – PAI-1 levels according to the genotypes of the polymorphisms rs2227631 and rs1799889

PCOS and control groups				
Genotypes				
	GG (n= 73) ₍₁₎	GA (n= 86) ₍₂₎	AA (n= 27) ₍₃₎	p
rs2227631 PAI-1 (µg/mL)	33.1 (34.3)	39.5 (25.6)	40.0 (38.4)	0.184 (a)
	5G5G (n= 45) ₍₁₎	5G4G (n= 84) ₍₂₎	4G4G (n= 43) ₍₃₎	p
rs1799889 PAI-1 (µg/mL)	35.4 (31.6)	38.2 (32.1)	42.1 (39.1)	0.771 (a)
PCOS group				
Genotypes				
	GG (n= 33) ₍₁₎	GA (n= 42) ₍₂₎	AA (n= 17) ₍₃₎	p
rs2227631 PAI-1 (µg/mL)	32.1 (31.2)	48.3 (27.5)	55.6 (47.6)	0.016* (a)
				0.009* (b)
				0.038* (c)
				0.472 (d)
	5G5G (n= 24) ₍₁₎	5G4G (n= 42) ₍₂₎	4G4G (n= 22) ₍₃₎	p
rs1799889 PAI-1 (µg/mL)	31.3 (44.4)	41.2 (31.2)	46.3 (49.1)	0.199 (a)

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels are shown as median and interquartile range. (rs2227631): Group 1 – Genotype GG; Group 2 – Genotype GA; Group 3 – Genotype AA. (rs1799889): Group 1 – Genotype 5G5G; Group 2 – Genotype 5G4G; Group 3 – Genotype 4G4G. (a) Kruskal-Wallis Test for groups 1, 2 and 3. (b) Mann-Whitney Test for groups 1 and 2. (c) Mann-Whitney Test for groups 1 e 3. (d) Mann-Whitney Test for groups 2 and 3. Kruskal-Wallis Test followed by Bonferroni correction. Significant*: $p < 0.05$. n = number of individuals in each genotype.

Table 5 – PAI-1 levels according to recessive and dominant model of inheritance for the polymorphisms rs2227631 and rs1799889

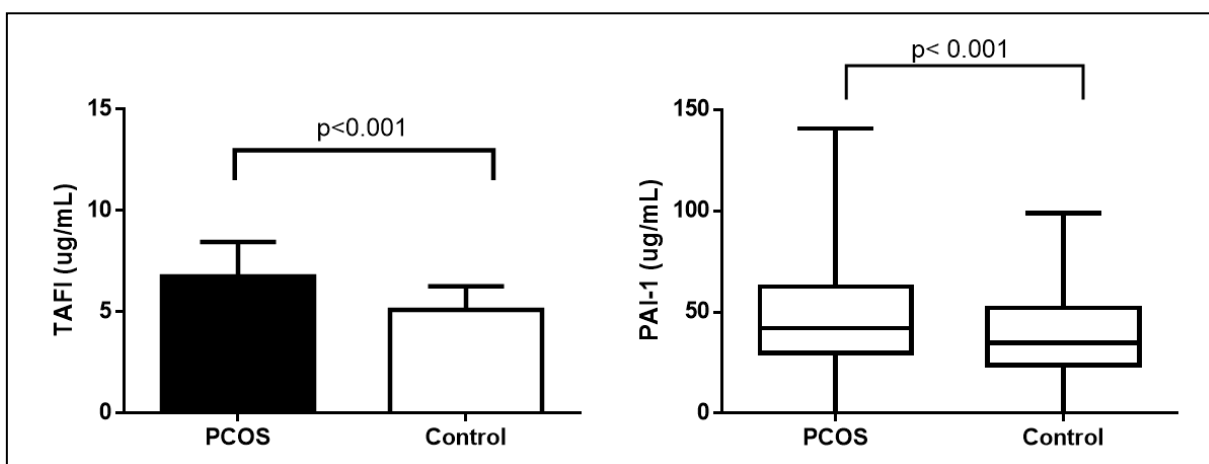
PCOS and control groups						
rs2227631						
	AA/GA (n= 113)	GG (n= 73)	p	GG/GA (n= 160)	AA (n= 27)	p
PAI-1 ($\mu\text{g/mL}$)	40.0 (26.3)	33.1 (34.3)	0.064	37.7 (30.0)	40.0 (38.4)	0.397
rs1799889						
	4G4G/5G4G (n= 127)	5G5G (n= 45)	p	5G5G/5G4G (n= 129)	4G4G (n= 43)	p
PAI-1 ($\mu\text{g/mL}$)	38.4 (32.1)	35.4 (31.6)	0.912	38.0 (31.6)	42.1 (39.1)	0.480
PCOS group						
rs2227631						
	AA/GA (n= 59)	GG (n= 33)	p	GG/GA (n= 75)	AA (n= 17)	p
PAI-1 ($\mu\text{g/mL}$)	48.6 (32.0)	32.1 (31.2)	0.005 *	39.5 (31.0)	55.6 (47.6)	0.146
rs1799889						
	4G4G/5G4G (n= 64)	5G5G (n= 24)	p	5G5G/5G4G (n= 66)	4G4G (n= 22)	p
PAI-1 ($\mu\text{g/mL}$)	42.9 (35.9)	31.3 (44.4)	0.107	39.0 (39.4)	46.3 (49.1)	0.190

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels are shown as median and interquartile range. *Mann-Whitney Test*. Significant: $p < 0.05$. n = number of individuals in each genotype.

Table 6 – Multivariate logistic regression considering PCOS and control groups as dependent variable.

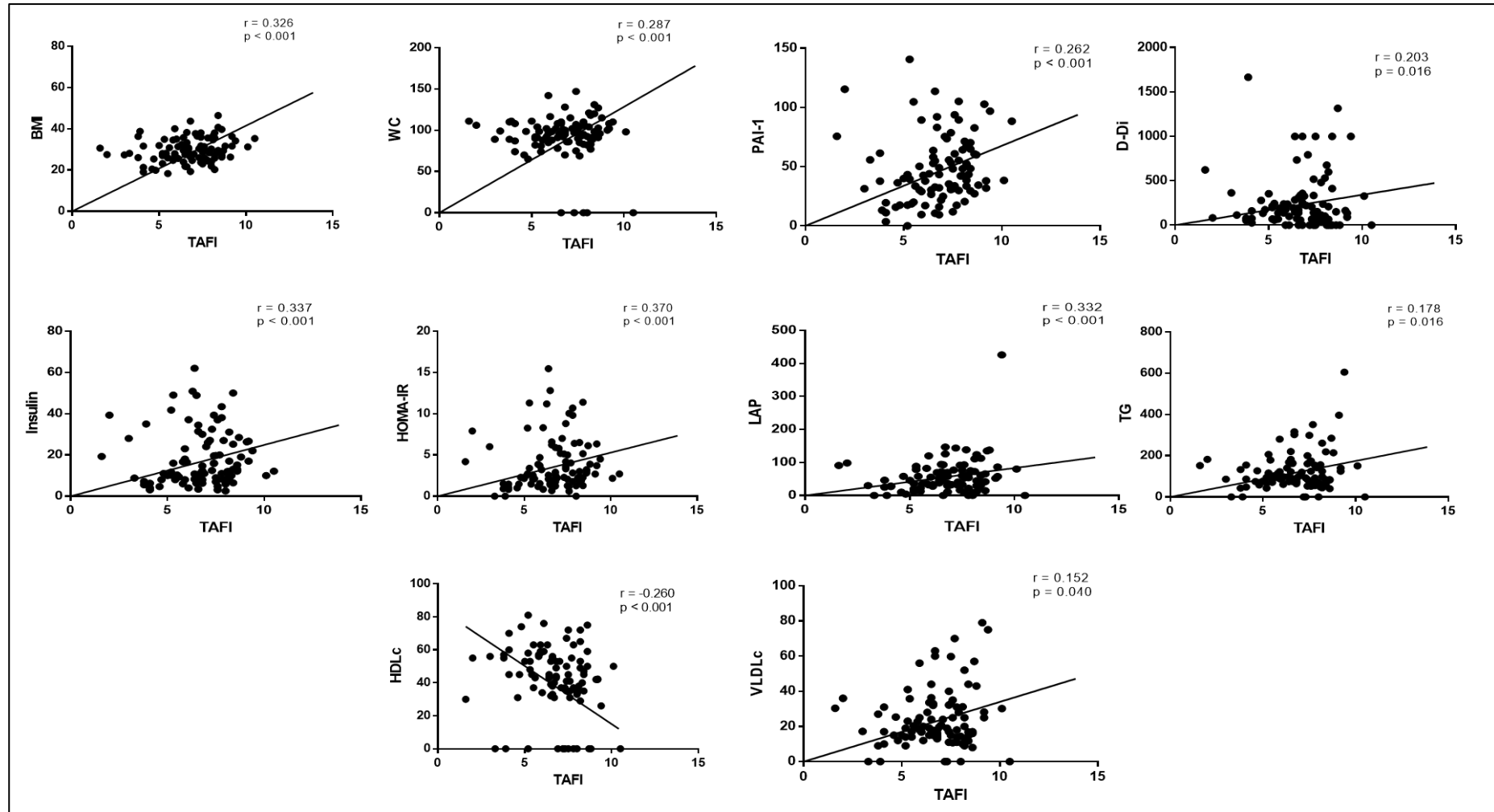
Variable	p	OR	IC
WC (cm)	< 0.001	0.902	0.867 – 0.939
Testosterone (ng/dL)	0.001	0.968	0.950 – 0.987
TAFI ($\mu\text{g/dL}$)	< 0.001	0.455	0.318 – 0.651

WC (waist circumference). Significant*: $p < 0.05$. *Hosmer and Lemeshow Test* = 0.416.

Figure 1 – Plasma TAFI and PAI-1 levels from PCOS and control groups

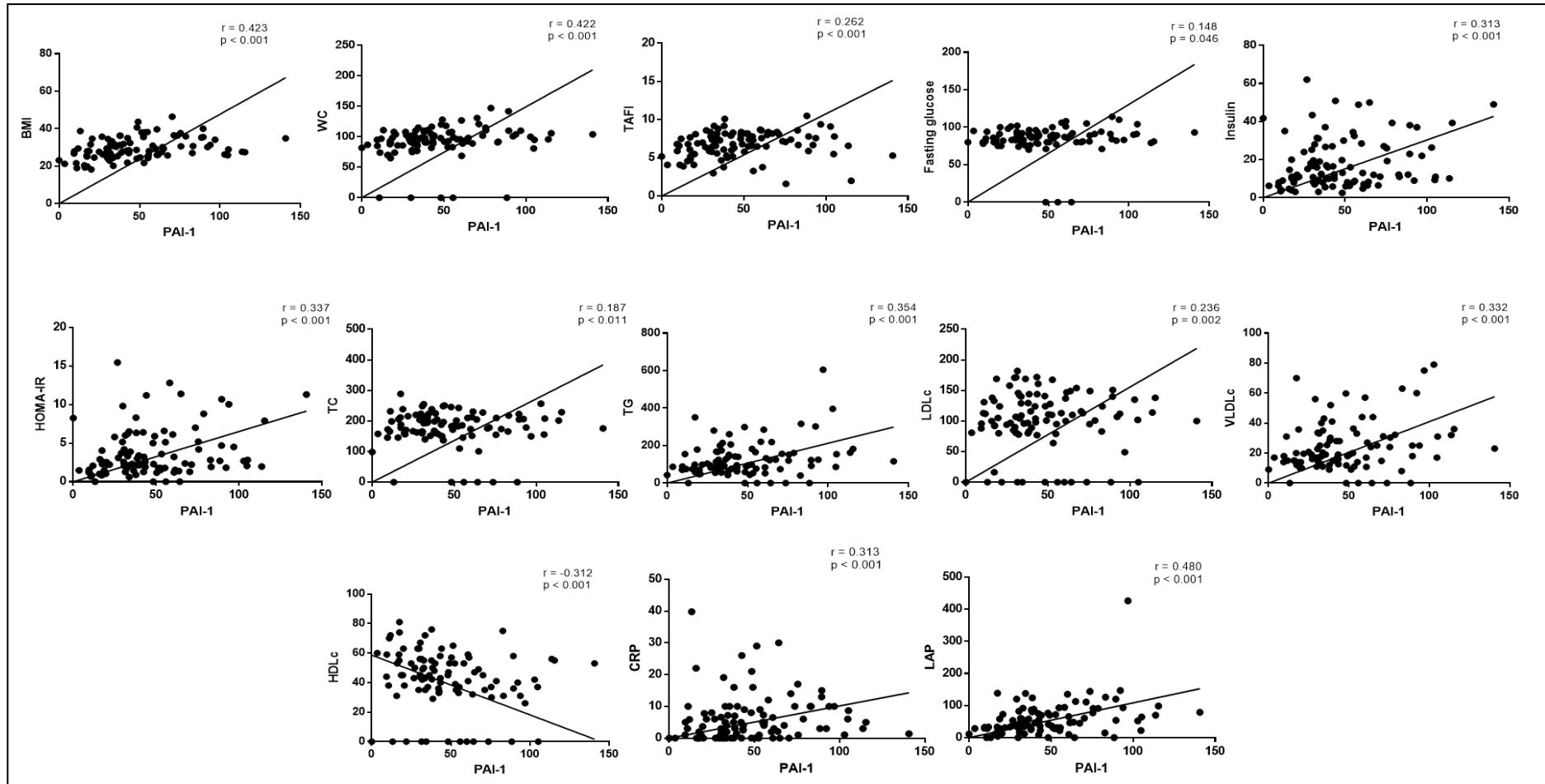
TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor): Student t teste. PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1): Mann-Whitney test. Significant*: $p < 0.05$.

Figure 2 – Correlations between TAFI levels and hemostatic and biochemical parameters and cardiovascular risk factors.



TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor), BMI (body mass index), WC (waist circumference), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), D-Di (D-dimer), HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin resistance), LAP (lipid accumulation product), TG (triglycerides), HDLc (high density lipoprotein cholesterol), VLDLc (very low density lipoprotein cholesterol). Participants = 189. Strength of the correlation: weak ($0.10 < r < 0.29$), moderate ($0.30 < r < 0.49$), strong ($0.50 < r < 1$) [53].

Figure 3 – Correlations between PAI-1 levels and hemostatic and biochemical parameters and cardiovascular risk factors.



PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), BMI (body mass index), TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor), HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin resistance), TC (total cholesterol), TG (triglycerides), LDLc (low density lipoprotein cholesterol), VLDLc (very low density lipoprotein cholesterol), CRP (C-reactive protein). Participants = 145. Strength of the correlation: weak ($0.10 < r < 0.29$), moderate ($0.30 < r < 0.49$), strong ($0.50 < r < 1$) [53].

9 Supplementary material

Table 1s - Allelic and genotypic frequency of *TAFI* polymorphisms in PCOS and control groups

rs3742264		PCOS (n= 79)		Control (n= 81)		
Genotype	n	Frequency	n	Frequency		p
GG	36	45.6%	31	38.3%		0.199
GA	38	48.1%	38	46.9%		
AA	5	6.3%	12	14.8%		
Allele	PCOS (n= 158)		Control (n= 162)			p
G	110	69.6%	100	61.7%		0.137
A	48	30.4%	62	38.3%		
rs1926447		PCOS (n= 94)		Control (n= 97)		
Genotype	n	Frequency	n	Frequency		p
CC	37	39.4%	34	35.1%		0.174
CT	45	48.0%	57	58.7%		
TT	12	12.6%	6	6.2%		
Allele	PCOS (n= 188)		Control (n=194)			p
C	119	63.3%	125	64.4%		0.817
T	69	36.7%	69	35.6%		
rs940		PCOS (n= 97)		Control (n= 97)		
Genotype	n	Frequency	n	Frequency		p
GG	64	66.0%	58	59.8%		0.532
GC	29	30.0%	32	33.0%		
CC	4	4.0%	7	7.2%		
Allele	PCOS (n= 194)		Control (n= 194)			p
G	157	81.0%	148	76.3%		0.265
C	37	19.0%	46	23.7%		

Chi-Square Test. Significant: $p < 0.05$.

Table 2s – Haplotype distribution of *TAFI* gene (rs3742264, rs1926447 and rs940) in PCOS and control groups

Haplotype	PCOS	Control	p
GCG	34.0%	32.0%	Reference
GCC	5.0%	2.0%	0.67
GTC	11.0%	20.0%	0.09
GTG	18.0%	8.0%	0.16
ACG	20.0%	30.0%	0.21
ATG	10.0%	6.0%	0.58

Pearson χ^2 -test or Fisher test. $p < 0.05$ was considered significant.

Table 3s - Allelic and genotypic frequency of *PAI-1* polymorphisms in PCOS and control groups

rs2227631		PCOS (n= 92)		Control (n= 94)		p
Genotype	n	Frequency	n	Frequency		
GG	33	35.8%	40	42.6%	0.285	
GA	42	45.7%	44	46.8%		
AA	17	18.5%	10	10.6%		
Allele	PCOS (n= 184)		Control (n= 188)		p	
G	108	58.7%	124	66%	0.148	
A	76	41.3%	64	(34.0%)		
rs1799889		PCOS (n= 88)		Control (n= 84)		p
Genotype	n	Frequency	n	Frequency		
5G5G	24	27.3%	21	25.0%	0.937	
5G4G	42	47.7%	42	50.0%		
4G4G	22	25.0%	21	25.0%		
Allele	PCOS (176)		Control (n=168)		p	
5G	90	51.1%	84	50.0%	0.817	
4G	86	48.9%	84	50.0%		

Chi-Square Test. Significant: $p < 0.05$.

Table 4s - Haplotype distribution of *PAI-1* gene (rs2227631 and rs1799889) in PCOS and control groups

Haplotypes	PCOS	Control	p
G5G	39.0%	46%	Reference
A4G	31%	31%	0.66
A5G	11.0%	5.0%	0.17
G4G	19.0%	18.0%	0.72

Pearson χ^2 -test or Fisher test. $p < 0.05$ was considered significant.

5 Discussão

O presente trabalho avaliou a associação entre três polimorfismos do *TAFI* com seus níveis plasmáticos e dois polimorfismos do *PAI-1* com os níveis plasmáticos dessa proteína em pacientes com SOP e em um grupo controle. Além disso, também foram comparados entre os grupos os níveis plasmáticos de dímero-D.

Mulheres portadoras da SOP estão propensas a elevado risco cardiovascular, com elevada frequência de obesidade, dislipidemia, diabetes e diversas complicações metabólicas como tolerância à glicose diminuída e resistência à insulina (BALDANI *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2015). Como esperado, os resultados mostram maiores índices de LAP, IMC, CA, HOMA-IR, testosterona, insulina, TG, CT, LDLc, e VLDLc além de menores níveis de HDLc nas pacientes quando comparadas ao grupo controle.

Tais resultados estão em concordância com trabalhos que evidenciaram níveis elevados de TAFI e PAI-1 em pacientes com SOP (YILDIZ *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2009; ADALI *et al.*, 2010). Yildiz *et al.*, ao avaliarem a capacidade fibrinolítica global de mulheres com SOP encontraram níveis semelhantes de dímero-D entre as pacientes e as mulheres saudáveis (YILDIZ *et al.*, 2002). Adali e colaboradores encontraram níveis de TAFI mais elevados em mulheres obesas e com sobrepeso portadoras da SOP, em comparação ao grupo controle (ADALI *et al.*, 2010). Lin e colaboradores, ao investigarem possíveis efeitos de polimorfismos do *PAI-1* em chinesas portadoras da SOP, encontraram níveis de PAI-1 elevados nessas mulheres em comparação com as mulheres saudáveis, confirmando o prejuízo da capacidade fibrinolítica das pacientes (LIN *et al.*, 2009).

As frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos rs3742264, rs1926447 e rs940 do gene do *TAFI* nos grupos SOP e controle não apresentaram diferença significativa, sugerindo que tais polimorfismos não estão associados ao desenvolvimento da SOP. Zheng e colaboradores avaliaram os efeitos de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) do gene do *TAFI* no risco da doença macrovascular diabética e não encontraram diferença significativa nas frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs3742264. Entretanto, a análise do polimorfismo rs1926447 revelou menor porcentagem do alelo T no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle (ZHENG *et al.*, 2015).

O estudo de Tokgoz *et al.*, que avaliou polimorfismos do TAFI em pacientes com trombose venosa cerebral, também evidenciou as frequências alélicas e genotípicas semelhantes entre os grupos caso e controle (TOKGOZ *et al.*, 2013). Tàssies e colaboradores mostraram menores frequências dos genótipos rs940GG e rs1926447TT em pacientes com síndrome coronariana aguda que apresentavam supra desnivelamento no segmento ST do eletrocardiograma (TÀSSIES *et al.*, 2009). A divergência entre os dados apresentados no presente estudo e a literatura pode ser parcialmente explicada pelos diferentes contextos genéticos da população. Além disso, os resultados apresentados no presente estudo não mostram relação entre haplótipos do gene do *TAFI* e a SOP.

Tem sido demonstrada importante associação entre os níveis de TAFI e seus polimorfismos (HENRY *et al.*, 2001; GÜLDAS *et al.*, 2015). A presença de SNPs na região 3' UTR pode afetar a quantidade de mRNA do *CPB2* por influenciar a estabilidade de transcrição desse gene ou a seleção do sítio de poliadenilação, resultando em menores níveis de TAFI (TÀSSIES *et al.*, 2009). O presente estudo traz dados novos para a literatura quando, ao apresentar seus resultados, revela, tanto em análise comparativa entre os genótipos, quanto em análise do modelo de herança recessivo e dominante, níveis de TAFI mais elevados nas carreadoras do genótipo GG do polimorfismo rs940 na população estudada como um todo (SOP + grupo controle) e no grupo SOP quando avaliado individualmente. Esses dados fornecem evidências preliminares para sugerir a influência desse genótipo nos níveis plasmáticos de TAFI nessa população. Esses são contrários aos resultados encontrados em diversos estudos realizados com diferentes populações (HENRY *et al.*, 2001; SUCKER *et al.*, 2009; TÀSSIES *et al.*, 2009). Em análise individual de polimorfismos do TAFI numa população de indivíduos caucasianos saudáveis, Henry e colaboradores encontraram menores níveis de TAFI nos carreadores do genótipo GG do rs940 (HENRY *et al.*, 2001). A presença do genótipo GG deste polimorfismo foi associada ao risco aumentado de microangiopatia trombótica em uma população alemã, contudo, os carreadores desse genótipo apresentaram menores níveis de TAFI. Uma explicação plausível para a divergência apresentada nos resultados pode ser as diferentes condições patológicas entre as populações estudadas, uma vez que este é o primeiro trabalho a avaliar a SOP.

Embora a etiologia da SOP ainda não seja totalmente elucidada, essa síndrome é considerada um distúrbio multifatorial que envolve anormalidades genéticas, endócrinas, hemostáticas e metabólicas (DE MENDONÇA-LOUZEIRO *et al.*, 2015). Sabendo-se que o TAFI é uma peça chave na regulação da fibrinólise e que tem sido associado a resistência à insulina e outras desordens (GÜLDAS *et al.*, 2015), o presente estudo investigou a correlação entre os níveis plasmáticos de TAFI e os parâmetros hemostáticos e bioquímicos, além de fatores de risco cardiovascular em ambos os grupos, SOP e controle. A conexão entre a SOP e estado de hipofibrinólise tem sido demonstrada em vários estudos (DE MENDONÇA-LOUZEIRO *et al.*, 2015; ROSENFELD *et al.*, 2016; SUR *et al.*, 2016). No presente estudo foi apresentada correlação entre os níveis plasmáticos de TAFI, PAI-1 e dímero-D. Esses dados estão em parcial concordância com o trabalho de Oral *et al.*, no qual foi encontrada correlação entre TAFI e PAI-1, não sendo apresentada correlação com dímero-D (ORAL *et al.*, 2009). Os níveis de testosterona apresentaram correlação positiva com os níveis de TAFI, contradizendo os dados de GÜLDAS *et al.*, que não encontraram correlação entre os níveis de TAFI e andrógenos (GÜLDAS *et al.*, 2015). Insulina, VLDLc, TG, HOMA-IR, LAP, IMC e CA também estão positivamente correlacionados com os níveis plasmáticos de TAFI. Além disso, foi encontrada correlação negativa entre níveis de TAFI e HDLc. Esses resultados corroboram com estudos que avaliaram populações de mulheres com SOP e mulheres saudáveis (ORAL *et al.*, 2009; DE MENDONÇA-LOUZEIRA *et al.*, 2013; GÜLDAS *et al.*, 2015). As correlações apresentadas ressaltam o risco de desordens hemostáticas e metabólicas que podem ser intensificados pelo aumento dos níveis de TAFI.

Os polimorfismos rs2227631 e rs1799889 do gene do *PAI-1* não apresentaram diferença significativa em suas frequências genotípicas e alélicas entre os grupos SOP e controle no presente estudo, o que sugere não haver relação entre estes polimorfismos e o desenvolvimento da SOP. Estudos de avaliação caso-controle em populações com diferentes condições como doença arterial coronariana (SU *et al.*, 2006; KOCH *et al.*, 2010) e abortos recorrentes (KIM *et al.*, 2014) apresentaram resultados similares para as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos. Abboud e colaboradores encontraram maior porcentagem do alelo 4G do polimorfismo rs1799889 e menor porcentagem do alelo A do rs2227631 em pacientes com infarto do miocárdio quando comparados ao grupo controle (ABBOUD *et al.*, 2010). Os achados divergentes entre os estudos podem ser resultado da natureza heterogênea

das populações estudadas. Além disso, os polimorfismos do PAI-1 não mostraram associação com a SOP por meio da análise de haplótipos.

É extensamente descrito na literatura que os níveis plasmáticos de PAI-1 são influenciados por vários polimorfismos encontrados em seu gene, dos quais destacam-se o rs1799889 e o rs2227631 (LIN *et al.*, 2009; VERSCHUUR *et al.*, 2005; GARCIA-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). O primeiro polimorfismo afeta a ligação de proteínas nucleares envolvidas na regulação da transcrição do gene do *PAI-1*. A homozigose para o alelo 4G tem sido associada com o aumento da transcrição do gene do *PAI-1* (MORANGE *et al.*, 2000). A substituição de uma guanina por uma adenina na posição -844 gera uma sequência consenso para a proteína nuclear ETs (família de fatores de transcrição que regulam positiva ou negativamente a expressão dos genes) que interfere potencialmente na regulação do gene do *PAI-1* (GARCIA-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Níveis mais elevados de PAI-1 são amplamente relacionados ao polimorfismo rs1799889, especialmente para o alelo 4G (LIN *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2016) e ao alelo A do rs2227631 (PARPUGGA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016). O presente estudo encontrou níveis elevados de PAI-1 em carreadoras do genótipo rs2227631AA.

Por meio de análise do modelo de herança recessivo e dominante observou-se, neste trabalho, maiores níveis de PAI-1 apenas em pacientes com SOP carreadoras dos genótipos rs2227631AA ou GA. Não foi encontrada diferença significativa quando a população foi avaliada reunida em um único grupo. Abboud e colaboradores encontraram resultados similares ao avaliarem a associação entre os polimorfismos rs2227631 e rs1799889 e os níveis de PAI-1 em pacientes com infarto do miocárdio. Foi demonstrado que os carreadores do rs2227631AA apresentaram maiores níveis de PAI-1 em relação ao grupo controle. Além disso, apontaram elevado risco de ocorrência de infarto nos pacientes com rs1799889-4G e rs2227631-A (ABBOUD *et al.*, 2010). Morange *et al.*, apontaram o genótipo rs2227631AA como um risco para trombose venosa em carreadores do fator V de Leiden (MORANGE *et al.*, 2000). O estudo realizado por Lin e colaboradores em uma população de chinesas portadoras da SOP apresentou maiores níveis de PAI-1 nas pacientes carreadoras do genótipo AA do polimorfismo rs2227631 quando comparadas ao grupo de mulheres saudáveis (LIN *et al.*, 2009). Esses dados permitem ressaltar o papel funcional do polimorfismo rs2227631 na regulação da expressão do gene do *PAI-1* em mulheres com SOP.

Os níveis de PAI-1 são influenciados não só por determinantes genéticos. Fatores metabólicos também desempenham importante papel na concentração plasmática de PAI-1 (CESARI *et al.*, 2010). As análises realizadas neste estudo demonstram correlação entre os níveis de PAI-1 e elementos determinantes da adiposidade, como IMC, CA e LAP, bem como com algumas características da síndrome metabólica, como insulina, HOMA-IR, glicemia em jejum, TG, CT, LDLc, VLDLc e HDLc (correlação negativa). Correlações semelhantes foram encontradas em diversos estudos. A avaliação de biomarcadores metabólicos em portadoras da SOP magras e com sobrepeso realizada por Cassar e colaboradores apresenta o PAI-1 como um preditor de resistência à insulina tanto em mulheres com SOP quanto em mulheres saudáveis (CASSAR *et al.*, 2015). Segundo Morange *et al.*, pacientes com infarto do miocárdio apresentaram correlação entre PAI-1 e os níveis de insulina e IMC (MORANGE *et al.*, 2000). As correlações entre PAI-1/HOMA-IR e PAI-1/TAFI estão em concordância com o estudo de Oral e colaboradores, que avaliaram parâmetros hemostáticos em mulheres portadoras de SOP na Turquia (ORAL *et al.*, 2009).

A conexão entre inflamação e o sistema fibrinolítico é amplamente descrita. Estudos experimentais *in vivo* realizados em modelos animais e em humanos tem mostrado que TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-6 (interleucina 6) contribuem de maneira importante para o aumento dos níveis de PAI-1. IL-6 é uma proteína de fase aguda da inflamação produzida após estímulo de TNF- α e IL-1 que induz a síntese de PCR (CESARI *et al.*, 2010), o que corrobora com a correlação positiva entre os níveis de PAI-1 e PCR apresentada no presente estudo.

Por fim, em análise de regressão logística multivariada, o presente trabalho aponta a circunferência abdominal, a testosterona e os níveis de TAFI independentemente associados à SOP. A associação da CA e da testosterona já eram esperadas, uma vez que a obesidade e o hiperandrogenismo são características da SOP, além do hiperandrogenismo ser um dos critérios de diagnóstico dessa síndrome. A associação do TAFI indica o prejuízo da capacidade fibrinolítica na SOP com aumento do risco cardiovascular das pacientes. Estudos a respeito do TAFI sugerem que seus níveis plasmáticos contribuem para a formação de trombos venosos e arteriais, além de estarem independentemente associados ao acidente vascular cerebral isquêmico (LADENVAL *et al.*, 2007; TOKGOZ *et al.*, 2013).

6 Considerações Finais

O tamanho reduzido da população analisada pode ser considerado uma limitação do presente estudo. No entanto, este é o primeiro relato, ao nosso conhecimento, indicando níveis mais elevados de TAFI em portadoras do genótipo GG do polimorfismo rs940 em mulheres com SOP isoladamente e todas as participantes reunidas em um único grupo. Os resultados mostraram que os níveis plasmáticos de TAFI e PAI-1 foram significativamente aumentados em mulheres com SOP e que o genótipo AA do polimorfismo rs2227631 exerce influência nos níveis plasmáticos de PAI-1 de mulheres com SOP levando a níveis mais elevados. Os dados demonstram uma associação independente dos níveis de TAFI, testosterona e circunferência abdominal com a SOP. Outros estudos devem ser conduzidos para validar nossos resultados em outras populações.

7 Referências

ABBOUD, N.; GHAZOUANI, L.; SAIDI, S.; BEM-HADJ-KHALIFA, S.; ADDAD, F.; ALMAWI, W.; MAHJOUR, T. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A Gene Polymorphisms and Changes in PAI-1/Tissue Plasminogen Activator Levels in Myocardial Infarction: A Case–Control Study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 14, n. 1, p. 23–27, 2010.

ADALI, E.; YILDIZHAN, R.; KURDOGLU, M.; BUGDAYCI, G.; KOLUSARI, A.; SAHIN, G. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in young obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 2, p. 666–672, 2010.

ALTIERI, P.; CAVAZZA, C.; PASQUI, F.; MORSELLI, A.; GAMBINERI, A.; PASQUALI, R. Dietary habits and their relationship with hormones and metabolism in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, v. 78, n. 1, p. 52–59, 2013.

ASO, Y.; WAKABAYASHI, S.; YAMAMOTO, R.; MATSUTOMO, R.; TAKEBAYASHI, K.; INUKAI, T. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 28, n. 9, p. 2211–2216, 2005.

AZZIZ, R. Introduction: Determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 1, p. 4–5, 2016.

AZZIZ, R.; ADASHI, E. Stein and Leventhal: 80 years on. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 214, n. 2, p. 247–247e1, 2016.

AZZIZ, R.; CARMINA, E.; DEWAILLY, D.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; ESCOBAR-MOREALE, H.; FUTTERWEIT, W.; JANSSEN, O.; LEGRO, R.; NORMAN, R.; TAYLOR, A.; WITCHEL, S. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility*, v. 91, n. 2, p. 456-488, 2009.

BALDANI, D. P.; SKRGATIC, L.; OUGOUAG, R. Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognized Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-Age Women. *International journal of endocrinology*. v. 2015, p. 1-17, 2015.

BARBOSA, G.; SÁ, L.; ROCHA, D.; ARBEX, A. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Fertility. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, v. 6, n. 6, p. 58–65, 2016.

BARTH, J.; FIELD, H.; YASMIN, E.; BALEN, A. Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: Measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *European Journal of Endocrinology*, v. 162, n. 3, p. 611–615, 2010.

BIASON-LAUBER, A.; MILLER, W.; PANDEY, A.; FLÜCK, C. Of marsupials and men: “Backdoor” dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 371, n. 1–2, p. 124–132, 2013.

BOFFA, M. B. *et al.* Effect of single nucleotide polymorphisms on expression of the gene encoding thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor: a functional analysis. *Blood*, v. 111, n. 1, p. 183–189, 2008.

BROUWERS, G.; LEEBEEK, F.; TANCK, M.; JUKEMA, J.; KLUFT, C.; MAAT, M. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thrombosis and hemostasis*, v. 90, n. 1, p. 92–100, 2003.

BUNNAGE, M., BLAGG, J., STEELE, J., OWEN, D., ALLERTON, C., MCELROY, A., MILLER, D., RINGER, T., BUTCHER, K., BEAUMONT, K., EVANS, K., GRAY, A., HOLLAND, S., FEEDER, N., MOORE, R., BROWN, D. Discovery of Potent & Selective Inhibitors of Activated Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor for the Treatment of Thrombosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 24, p. 6095 – 6163, 2007.

CAGLIYAN, C.; YUREGIR, O.; BALLI, M.; TEKIN, K.; AKILLI, R.; BOZDOGAN, S.; TURKMEN, S.; DENIZ, A.; BAYKAN, O.; ASLAN, H.; CAYLI, M. Plasminogen activator inhibitor-1 5G/5G genotype is associated with early spontaneous recanalization of the infarct-related artery in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction. *Coronary Artery Disease*, v. 24, n. 3, p. 196–200, 2013.

CASSAR, S.; TEEDE, H.; HARRISON, C.; JOHAN, A.; MORAN, L.; STEPTO, N. Biomarkers and insulin sensitivity in women with Polycystic Ovary Syndrome: Characteristics and predictive capacity. *Clinical Endocrinology*, v. 83, n. 1, p. 50–58, 2015.

CESARI, M.; PAHOR, M.; INCALZI, R. A. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, n. 5, p. 72–91, 2010.

CHEN, W.; ZOUBOULIS, C. Hormones and the pilosebaceous unit. *Dermato-endocrinology*, v. 1, n. 2, p. 81–86, 2009.

CHEN, X.; JIA, X.; QIAO, J.; GUAN, Y.; KANG, J. Adipokines in reproductive function: A link between obesity and polycystic ovary syndrome. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 50, n. 2, p. R21 – R37, 2013.

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences Lawrence Erlbaum Associates. *Hillsdale, NJ*, p. 20–26, 1988.

CONWAY, G.; DEWAILLY, D.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; ESCOBAR-MORREALE, H.; FRANKS, S.; GAMBINERI, A.; KELESTIMUR, F.; MACUT, D.; MICIC, D.; RASQUALI, R.; PFEIFER, M.; PIGNATELLI, D.; PUGREAT, M.; YILDIZ, B. The polycystic ovary syndrome: A position statement from the European Society of Endocrinology. *European Journal of Endocrinology*, v. 171, n. 4, p. P1–P29, 2014.

CRAEN, B.; DECLERCK, P.; GILS, A. The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis Research*, v. 130, n. 4, p. 576–585, 2012.

DE LA CRUZ-MOSSO, U.; MUÑOZ-VALLE, J.; SALGADO-GOYTIA, L.; GARCIA-CARRÓN, A.; ILLADES-AGUIAR, B.; CASTAÑEDA-SAUCEDO, E.; PARRA-ROJAS, I. Relationship of metabolic syndrome and its components with 844 G/A and HindIII C/G PAI-1 gene polymorphisms in Mexican children. *BMC Pediatrics*, v. 12, n. 1, p. 41- 49, 2012.

DAY, F.; HINDS, D.; TUNG, J.; STOLK, L.; STYRKARSDOTTIR, U.; SAXENA, R.; BJONNES, A.; BROER, L.; DUNGER, D.; HALLDORSSON, B.; LAWLOR, D.; LAVAL, G.; MATHIESON, I.; MCCARDLE, W.; LOUWERS, Y.; MEUN, C.; RING, S.; SCOTT, R.; SULEN, P.; UITTERLINDEN, A.; WAREHAN, N.; THORSTEINSDOTTIR, U.; WELT, C.; STEFANSSON, K.; LAVEN, J.; ONG, K.; PERRY, J. Causal mechanisms and balancing selection inferred from genetic associations with polycystic ovary syndrome. *Nature communications*, v. 6, p. 8464, 2015.

DE MENDONÇA-LOUZEIRO, M.; ANNICHINO-BIZZACHI, J.; MAGNA, L.; QUAINO, S.; BENETTI-PINTO, C. Faster thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome compared with healthy controls matched for age and body mass index. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 6, p. 1786–1790, 2013.

DE MENDONÇA-LOUZEIRO, M.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.; BENETTI-PINTO, C. Android fat distribution affects some hemostatic parameters in women with polycystic ovary syndrome compared with healthy control subjects matched for age and body mass index. *Fertility and Sterility*, v. 104, n. 2, p. 467–473, 2015.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine reviews*, v. 33, n. 6, p. 981–1030, 2012.

DOKRAS, A.; SARWER, D.; ALLISON, K.; MILMAN, L.; KRIS-ETHERTON, P.; KUNSELMAN, A.; STETTER, C.; WILLIAMS, N.; GNATUK, C.; ESTES, S.; FLEMING, J.; COUTIFARIS, C.; LEGRO, R. Weight Loss and Lowering Androgens Predict Improvements in Health Related Quality of Life in Women with PCOS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 101, n. 8, p. 2966 – 2974, 2016.

DRAXLER, D.; MEDCALF, R. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? *Transfusion Medicine Reviews*, v. 29, n. 2, p. 102–109, 2015.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews*, v. 18, n. 6, p. 774-800, 1997.

EREM, C.; KOCAK, M.; NUHOGLU, I.; YILMAZ, M.; UCUNCU, O. Blood Coagulation, Fibrinolysis and Lipid Profile in Patients With Prolactinoma. *Clinical Endocrinology*, v.73, n.4, p. 502–507, 2009.

ESCOBAR-MORREALE, H.; CARMINA, E.; DEWAILLY, D.; GAMBINERI, A.; KELESTIMUR, F.; MOGHETTI, P.; PUGEAT, M.; QIAO, J.; WIJEYARATNE, C.; WITCHEL, S.; NORMAN, R. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: A consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome society. *Human Reproduction Update*, v. 18, n. 2, p. 146–170, 2012.

FAUSER, B.; CHANG, J.; AZZIZ, R.; LEGRO, R.; DEWAILLY, D.; FRANKS, S.; TARLATZIS, R.; BALEN, A.; BOUCHARD, PH.; DAHLGREN, E.; DEVOTO, L.; DIAMANTI, E.; DUNAIF, A.; FILICORI, M.; HOMBURG, R.; IBANEZ, L.; LAVEN, J.; MAGOFFIN, D.; NESTLER, J.; NORMAN, R.; PASQUALI, P.; PUGEAT, M.; STRAUSS, J.; TAN, S.; TAYLOR, A.; WILD, R.; WILD, S.; GUZICK, D.; EHRMANN, D.; LOBO, R. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v.81, n.1, p.19-25, 2004.

FAWZY, M.; MOHAMMED, E.; AHMED, A.; FAKHR-ELDEEN, A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor Thr325Ile polymorphism and plasma level in breast cancer: A pilot study. *Meta Gene*, v. 4, p. 73–84, 2015.

FERREIRA, C.; SOUZA, M.; DUSSE, L.; CARVALHO, M. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.

FRANCO, R. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. *Medicina*, v. 34, n. 3–4, p. 229–237, 2001.

GARAND, M.; LIN, J.; ZAGORA, B.; KOSCHINSKY, M.; BOFFA, M. Regulation of the gene encoding human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor by estrogen and progesterone. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 24, n. 4, p. 393–404, 2013.

GARCIA, M.; SUNG, N.; MULLENIX, T.; DAMBAEVA, S.; BEAMAN, K.; GILMAN-SACHS, A.; KWAK-KIM, J. Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism is Associated with Reproductive Failure: Metabolic, Hormonal, and Immune Profiles. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 76, n. 1, p. 70–81, 2016.

GONG, L.; PENG, J.; HAN, F.; ZHU, J.; FANG, L.; WANG, Y.; DU, G.; WANG, H.; LIU, L. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: A meta-analysis. *Thrombosis Research*, v. 130, n. 3, p. e43–e51, 2012.

GONZÁLEZ, F.; CARTULA, J.; FERNÁNDEZ, M.; CARRASCO, R.; MARCO, P.; SÁNCHEZ, J.; BENLLOCH, S. Valor pronóstico de la concentración del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina y del polimorfismo C1040T en el infarto agudo de miocardio tratado con fibrinólisis. *Medicina Intensiva*, v. 34, n. 8, p. 513–522, 2010.

GONZÁLEZ, F.; KIRWAN, J.; ROTE, N.; MINIUM, J. Elevated circulating levels of tissue factor in polycystic ovary syndrome. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, v. 19, n. 1, p. 66–72, 2013.

GONZÁLEZ, I.; VALLE, Y.; PINTO, E.; ALVARADO, E.; HARO, A.; VALLE, J.; SALINAS, H.; VELLANUEVA, L.; RODRÍGUEZ, N.; GUTIÉRREZ, J. The -844 G>A

PAI-1 Polymorphism Is Associated with Acute Coronary Syndrome in Mexican Population. *Disease Markers*, v. 2015, n. August, p. 1–7, 2015.

GOODARZI, M.; DUMESIC, D.; CHAZENBALK, G.; AZZIZ, R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 7, n. 4, p. 219–231, 2011.

GÜLDAŞ, M.; ALTINKAYA, S.; NERGİZ, S.; DEMIRCAN-SEZER, S.; YÜKSELA, H. Elevated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, v. 31, n. 7, p. 536–539, 2015.

HAYES, M.; URBANEK, M.; EHRMANN, D.; ARMSTRONG, L.; LEE, J.; SISK, R.; KARADERI, T.; BARBER, T.; MCCARTHY, M.; FRANKS, S.; LINDGREN, C.; WELT, C.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; PANIDIS, D.; GOODARZI, M.; AZZIZ, R.; ZHANG, Y.; JAMES, R.; OLIVIER, M.; KISSEBAH, A.; STENER-VICTORIN, E.; LEGRO, R.; DUNAIF, A. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nature communications*, v. 6, n. February 2016, p. 7502, 2015.

HENRY, M.; AUBERT, H.; MORANGE, P.; NANNI, I.; ALESSI, M.; TIRET, L.; JUHAN-VAGUE, I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: Evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood*, v. 97, n. 7, p. 2053–2058, 2001.

HERTWECK, S.; YOOST, J.; MCCLURE, M.; SIOW, Y.; BROCK, G.; WINTERGERST, K.; FALLAT, M. Ferriman-Gallwey Scores, Serum Androgen and Mullerian Inhibiting Substance Levels in Hirsute Adolescent Girls. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. v. 25, n. 5, p. 300–304, 2012.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews*, v. 17, n. SUPPL. 1, p. 51–55, 2003.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, v. 16, n. 1–2, p. 17–20, 2004.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2007.

HOMBURG, R. Polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 22, n. 2, p. 261–274, 2008.

HOUSMAN, E.; REYNOLDS, R. Polycystic ovary syndrome: A review for dermatologists: Part I. Diagnosis and manifestations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 71, n. 5, p. 847.e1-847.e10, 2014.

IWAKI, T.; URANO, T.; UMEMURA, K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *British Journal of Haematology*, v. 157, n. 3, p. 291–298, 2012.

KAHN, H. The “lipid accumulation product” performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC cardiovascular disorders*, v. 5, n. 1, p. 26 - 36, 2005.

KARÁSEK, D.; VAVERKOVÁ, H.; HALENKA, M.; SLAVÍČ, L.; NOVOTNÝ, D. Endothelial haemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thrombosis Research*, v. 123, n. 3, p. 466–475, 2009.

KIM, J.; CHOI, Y.; LEE, S.; YANG, K.; PAIK, E.; JEONG, H.; JUN, J.; HAN, A.; HONG, M. The PAI-1 4G/5G and ACE I/D Polymorphisms and Risk of Recurrent Pregnancy Loss: A Case–Control Study. *American Journal of Reproductive Immunology*. v. 72, n. 6, p. 571-576, 2014.

KOCH, W.; SCHREMPF, M.; ERL, A.; MUELLER, J.; HOPPMANN, P.; SCHÖMIG, A.; KASTRATI, A. 4G/5G polymorphism and haplotypes of SERPINE1 in atherosclerotic diseases of coronary arteries. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 103, n. 6, p. 1170–1180, 2010.

KOKOSAR, M.; BENRICK, A.; PRFILYEV, A.; FORNES, R.; NILSSON, E.; MALIQUEO, M.; BEHRE, C.; SAZONOVA, A.; OHLSSON, C.; LING, C.; STENER-VICTORIN, E. Epigenetic and Transcriptional Alterations in Human Adipose Tissue of Polycystic Ovary Syndrome. *Scientific Reports*, v. 6, n. February, p. 22883, 2016.

LAI, Y.; CHEN, J.; LI, L.; YIN, J.; HE, J.; YANG, M.; JIA, Y.; LIU, D.; LIU, H.; LIAO, Y.; YANG, G. Circulating Zinc-alpha2-glycoprotein levels and Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome. *Sci Rep*, v. 6, n. 1, p. 25934, 2016.

LEGRO, R.; ARSLANIAN, A.; EHRMAN, D.; HOEGER, K.; MURAD, M.; PASQUALI, R.; WELT, C. Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 98, n. 12, p. 4565–4592, 2013.

LIM, S.; DAVIS, M.; NORMAN, R.; MORAN, L. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, v. 18, n. 6, p. 618–637, 2012.

LIN, S.; HUIYA, Z.; BO, L.; WEI, W.; YONGMEI, G. The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 2844 A/G and 2675 4G/5G promoter polymorphism significantly influences plasma PAI-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, v. 36, n. 3, p. 503 – 509, 2009.

LIU, Y.; SUN, MG.; JIANG, R.; DING, R.; CHE, Z.; CHEN, YY.; YAO, CJ.; ZHU, XX.; CAO, JY. Plasminogen Activator Inhibitor-1 -675 4G/5G Polymorphism and Polycystic Ovary Syndrome Risk: A Meta Analysis. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*, v. 31, n. 3, p. 363 – 370, 2014.

LIZNEVA, D.; SUTURINA, S.; WALKER, W.; BRAKTA, S.; GAVRILOVA-JORDAN, L.; AZZIZ, R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 1, p. 6–15, 2016.

LONGSTAFF, C.; KOLEV, K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 13, n. C, p. S98–S105, 2015.

MALAVAZOS, A.; CEREDA, E.; ERMETICI, F.; CACCIALANZA, R.; BRIGANTI, S.; RONDANELLI, M.; MORRICONE, L. The “Lipid Accumulation Product” Is Associated with 2-Hour Postload Glucose Outcomes in Overweight/Obese Subjects with Nondiabetic Fasting Glucose. *International Journal of Endocrinology*, v. 2015, p. 1–8, 2015.

MANNERAS-HOLM, L.; BAGHAEI, F.; HOLM, G.; JANSON, P.; OHLSSON, C.; LÖNN, M.; STENER-VICTORIN, E. Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 96, n. 4, p. 1068–1076, 2011.

MANSUR, A.; FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 99, n. 2, p. 755–61, 2012.

MARCONDES, J.; BARCELLOS, C.; ROCHA, M. Difficulties and pitfalls in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 55, n. 1, p. 6–15, 2011.

MCMICHAEL, M. New Models of Hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 27, n. 2, p. 40–45, 2012.

MERCER, P.; CHAMBERS, R. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1832, n. 7, p. 1018–1027, 2013.

MOBEEN, H.; AFZAL, N.; KASHIF, M. Polycystic Ovary Syndrome May Be an Autoimmune Disorder. *Scientifica*, v. 2016, n. Table 2, p. 1 – 7, 2016.

MORAN, L.; MISSO, M.; WILD, R.; NORMAN, R. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, v. 16, n. 4, p. 347–363, 2010.

MORANGE, P.; HENRY, M.; TREGOUET, D.; GRANEL, B.; AILLAUD, M.; ALESSI, M.; JUHAN-VAGUE, I. The A -844G Polymorphism in the PAI-1 Gene Is Associated With a Higher Risk of Venous Thrombosis in Factor V Leiden Carriers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 20, n. 5, p. 1387–1391, 2000.

MORANGE, P. SAUT, N.; ALESSI, M.; YUDKIN, J.; MARGAGLIONE, M.; MINNO, G.; HAMSTEN, A.; HUMPHRIES, S.; TREGOUET, D.; JUHAN-VAGUE, I. Association of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs With Myocardial Infarction, Plasma PAI-1, and Metabolic Parameters: The HIFMECH Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 10, p. 2250–2257, 2007.

MUSI, N.; GUARDADO-MENDOZA, R. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, v. 89, n. 6, p. 229–237, 2014.

NADERI, M.; DORGALALEH, A.; ALIZADEH, S.; KHATIB, Z.; TABIBIAN, S.; KAZEMI, A.; DARGAHI, H.; BAMEDI, T. Polymorphism of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and risk of intracranial haemorrhage in factor XIII deficiency. *Haemophilia*, v. 20, n. 1, p. e89 – e92, 2013.

NASCIMENTO, J.; CHEIN, M.; SOUSA, R.; FERREIRA, A.; NAVARRO, P.; BRITO, L. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids in Health and Disease*, v. 14, n. 62, p. 1–8, 2015.

NESHEIM, M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest*, v. 124, n. 3 suppl, p. 33–39, 2003.

NESTLER, J. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Human Reproduction*, v. 12, n. suppl, p. 53-62, 1997.

ORAL, B.; MERMI, B.; DILEK, M.; ALANOGLU, G.; SÜTÇÜ, R. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 110-116, 2009.

OWCZAREK, D.; UNDAS, A.; FOLEY, J.; NESHEIM, M.; JABLONSKI, K.; MACH, T. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) is associated with inflammatory markers in inflammatory bowel diseases. TAFIa level in patients with IBD. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 6, n. 1, p. 13–20, 2012.

PARPUGGA, T.; TATARUNAS, V.; SKIPSKIS, V.; KUPSTYTE, N.; ZALIADUONYTE-PEKSIENE, D.; LESAUSKAITE, V. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Disease markers*, v. 2015, n., p. 1–8, 2015.

PASQUALI, R.; STENER-VICTORIN, E.; YILDIZ, B.; DULEBA, A.; HOEGER, K.; MASON, H.; HOMBURG, R.; HICKEY, T.; FRANKS, S.; TAPANAINEM, J.; BALEN, A.; ABBOTT, D.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; LEGRO, R. PCOS Forum: Research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clinical Endocrinology*, v. 74, n. 4, p. 424–433, 2011.

PLUG, T.; MEIJERS, J. New clues regarding the mysterious mechanism of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor self-destruction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 13, n. 6, p. 1081–1083, 2015.

PLUG, T.; MEIJERS, J. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 14, n. 4, p. 633–644, 2016.

POST, M.; HENDRIKS, D.; VAN DER MOOREN, M.; VAN BAAL, W.; LEURS, J.; EMEIS, J.; KENEMANS, P.; STEHOUWER, C. Oral oestradiol/trimegestone replacement reduces procarboxypeptidase U (TAFI): A randomized, placebo-controlled, 12-week study in early postmenopausal women. *Journal of Internal Medicine*, v. 251, n. 3, p. 245–251, 2002.

QIAN, K.; XU, J.; WAN, H.; FU, F.; LU, J.; LIN, Z.; LIU, Z.; LIU, H. Impact of genetic polymorphisms in thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) on venous thrombosis disease : A meta-analysis. *Gene*, v. 569, n. 2, p. 173–181, 2015.

QU, H.; LI, Q.; RENTFRO, A.; FISHER-HOCH, S.; MCCORMICK, J. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for americans of mexican descent using machine learning. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, p. 4–7, 2011.

ROE, A.; DOKRAS, A. The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Reviews in obstetrics & gynecology*, v. 4, n. 2, p. 45–51, 2011.

ROSENFELD, R.; EHRMANN, D. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Endocrine Reviews*, v. 37 n. 5, p. 467 - 520, 2016.

SANTOS, I.; FERNANDES, A.; CARVALHO, M.; SOUSA, M.; FERREIRA, C.; GOMES, K. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels and its polymorphism rs3742264 are associated with dyslipidemia in a cohort of Brazilian subjects. *Clinica Chimica Acta*, v. 433, p. 76-83, 2014.

SHAN, Y.; WANG, A.; SUN, Y.; JIANG, J.; PANG, B.; NA, Z.; DU, X.; WANG, W.; HUANG, Z. Coagulation and fibrinolytic indices during the first trimester of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: a preliminary study. *Reproductive Sciences*, v. 20, n. 11, p. 1390–1397, 2013.

SHIVAPRAKASH, G.; BASU, A.; KAMATH, A.; SHIVAPRAKASH, P.; ADHIKARI, P.; UP, R.; GOPALAKRISHNA, H.; PADUBIDRI, J. Acanthosis Nigricans in PCOS Patients and Its Relation with Type 2 Diabetes Mellitus and Body Mass at a Tertiary Care Hospital in Southern India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v. 7, n. 2, p. 317– 319, 2013.

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

SOLORZANO, C.; BELLER, J.; ABSHIRE, M.; COLLINS, J.; MCCARTNEY, C.; MARSHAL, J. Neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Steroids*, v. 77, n. 4, p. 332–337, 2012.

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

SU, S.; CHEN, S.; ZHAO, J.; HUANG, J.; WANG, X.; CHEN, R.; GU, D. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene: Selection of Tagging Single Nucleotide Polymorphisms and Association With Coronary Heart Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 26, n. 4, p. 948–954, 2006.

SUCKER, C.; HETZEL, G.; FAROKHZAD, F.; DAHHAN, F.; SCHMITZ, M.; KURSCHAT, C.; GRABENSEE, B.; MARUHN-DEBOWSKI, B.; ZOTZ, R.; SCHARF, R. Association of genotypes of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitors with thrombotic microangiopathies—a pilot study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 22, n. 5, p. 1347–1350, 2007.

SUR, D.; CHAKRAVORTY, R. Association of coronary heart disease risk and lipid profile in indian women with polycystic ovarian syndrome. *v. 5, n. 1, p. 23–26, 2016.*

TANAKA, K.; KEY, S.; LEVY, J. Blood coagulation: Hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia and Analgesia, v. 108, n. 5, p. 1433–1446, 2009.*

TÀSSIES, D.; ROQUÉ, M.; MONTEAGUDO, J.; MARTORELL, T.; SIONIS, A.; ARZAMENDI, D.; HERAS, M.; REVERTER, JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome. *Thrombosis Research, v. 124, n. 5, p. 614–618, 2009.*

THELWELL, C. Fibrinolysis standards: A review of the current status. *Biologicals, v. 38, n. 4, p. 437–448, 2010.*

TOFLER, G.; MASSARO, J.; O'DONNELL, C.; WILSON, P.; VASAN, R.; SUTHERLAND, P.; MEIGS, J.; LEVY, D.; DÁGOSTINO, R. Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *Thrombosis Research, v. 140, p. 30–5, 2016.*

TOKGOZ, S.; ZAMANI, A.; DURAKBASI-DURUN, H.; YILMAZ, O.; IHHAN, N.; DEMIREL, S.; TAVLI, M.; SIMAN, A. TAFI gene polymorphisms in patients with cerebral venous thrombosis. *Acta Neurologica Belgica, v. 113, n. 3, p. 291–297, 2013.*

TREGOUET, D.; SCHNABEL, R.; ALESSI, M.; GODEFROY, T.; DECLERK, P.; NICAUD, V.; MUNZEL, T.; BICKEL, C.; RUPPRECHT, H.; LUBOS, E.; ZELLER, T.; JUHAN-VAGUE, I.; BLANKENBERG, S.; TIRET, L.; MORANGE, P. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH, v. 7, n. 1, p. 49–57, 2009.*

VAUGHAN, D. PAI-1 antagonists: the promise and the peril. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association, v. 122, p. 312–25, 2011.*

VERSCHUUR, M.; JELLEMA, A.; BLADBJERG, E.; FESKENS, E.; MENSINK, R.; MØLLER, L.; VOS, H.; MAAT, M. The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter haplotype is related to PAI-1 plasma concentrations in lean individuals. *Atherosclerosis, v. 181, n. 2, p. 275–284, 2005.*

VERSTEEG, H.; HEEMSKERK, J.; LEVI, M.; REITSMA, P. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews, v. 93, n. 1, p. 327–58, 2013.*

VINE, A. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina (Philadelphia, Pa.), v. 29, n. 1, p. 1–7, 2009.*

WANG, L.; WANG, L-M.; ZHOU, N. 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with polycystic ovary syndrome in Chinese patients: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics, p. 1–4, 2015.*

WANG, S.; ZHANG, H.; DONG, C.; SUN, H. Meta-analysis of TAFI polymorphisms and risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p. 1–13, 2016.

WELT, C.; CARMINA, E. Lifecycle of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): From In Utero to Menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 98, n. 12, p. 4629–4638, 2013.

WILTGEN, D. BEMEDETTO, I.; MASTELLA, L.; SPRITZER, P. Lipid accumulation product index: A reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, v. 24, n. 7, p. 1726–1731, 2009.

XU, X.; WANG, H.; LI, H.; CUI, X.; ZHANG, H. SERPINE1 -844 and -675 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese Han population. *Journal of International Medical Research*, v. 44, n. 6, p. 1292–1301, 2016.

YILDIZ, B.; HAZNEDAROGLU, I.; KIRAZLI, S.; BAYRAKTAR, M. Global Fibrinolytic Capacity Is Decreased in Polycystic Ovary Syndrome, Suggesting a Prothrombotic State. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.87, n.8, p. 3871–3875, 2002.

ZHENG, C.; LI, X.; KONG, C.; KE, S.; PENG, C.; CUI, T.; GAO, M.; ZHOU, Y.; GUO, W.; HUANG, L.; PETERSEN, R.; HUANG, H. Effect of single nucleotide polymorphism in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on the risk of diabetic macrovascular disease. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 26, n. 2, p. 185–190, 2015.

8 Anexos

ANEXO A



**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.


**Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B



Dr. (a) JULIANE DE CARVALHO ALBUQUERQUE,

Co-autores:

SILVA, F. S.; CANDIDO, A. L.; BORGES, K. B. G.; FERREIRA, C. N.;

Com grande satisfação, informamos que o resumo de Tema Livre de sua autoria intitulado "ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO C1542G (RS940) DO GENE DO INIBIDOR DA FIBRÍNOLISE ATIVADO PELA TROMBINA (TAFI) EM PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS." foi avaliado pelos revisores como MUITO BOM ou EXCELENTE e, desta forma, foi selecionado para **apresentação ORAL** no 51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.

De forma a possibilitar maior divulgação científica e interação entre os participantes, neste ano foram selecionados os 59 melhores resumos, que serão apresentados em grupos de 5 (cinco).

Como informado na página do congresso, os autores deverão fazer sua **apresentação** diante do totem indicado na tabela abaixo, onde seu trabalho estará disponível na forma de pôster eletrônico.

A **apresentação** deverá ser de 5 minutos, restando 10 minutos para arguição e debates pelos avaliadores e demais participantes.

As apresentações **orais** ocorrerão no 1º Piso na Área de Exposição, durante o intervalo de 13 às 14:15h dos dias 26 e 27/09 (terça e quarta-feira), conforme distribuição abaixo (número do resumo). Solicitamos que os apresentadores estejam presentes no local às 12:45h.

ANEXO C



CLÁUDIA NATÁLIA FERREIRA

Co-autores:

ALBUQUERQUE, J. C.; RIBEIRO, T. H. O.; CANDIDO, A. L.; BORGES, K. B. G.;

Com satisfação informamos que o resumo intitulado **INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO -844A/G NO GENE DO INIBIDOR DO ATIVADOR TECIDUAL DO PLASMINOGÊNIO (PAI-1) EM PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS** foi selecionado para ser apresentado em forma de **PÔSTER ELETRÔNICO**, no 51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, e o 3º Congresso Brasileiro de Informática Laboratorial, no Palácio das Convenções do Anhembi Parque, São Paulo, SP, de 26 a 29 de setembro de 2017.

Ressaltamos que é imprescindível que pelo menos um dos autores esteja devidamente registrado no 51º Congresso da SBPC/ML. Deste modo, os autores poderão realizar seu registro no evento até **18/08/2017**. Caso não haja autor registrado no evento até esta data, o resumo não fará parte da publicação.

Para realizar a inscrição, acessar www.cbpcml.org.br e localizar Inscrição. Digitar o CPF e selecionar a categoria de inscrição (ao escolher a forma de pagamento, o sistema automaticamente processará os valores conforme valor inicial para registro prévio).

Lembramos que as instruções e sugestões para confecção do pôster eletrônico estão disponíveis em www.cbpcml.org.br.

Aceitem, em nome da Comissão Organizadora, nossos sinceros parabéns!

Atenciosamente,

ANEXO D

Certificamos que

JULIANE DE CARVALHO ALBUQUERQUE

participou do



**48º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial** *Exposição Técnico-Científica*

**A evolução do conhecimento científico
e as contribuições da Medicina Laboratorial**

2014
setembro
9 a 12

Centro de Convenções SulAmérica
www.cbpcml.org.br

na qualidade de autor responsável do tema livre **"THROMBIN-ACTIVABLE
FIBRINOLYSIS INHIBITOR LEVELS AND THR325ILE POLYMORPHISM IN WOMEN
WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME"**, tendo como co-autores "CANDIDO, A. L.,
FRANÇA, M. O. S., BORGES, K. B. G., FERREIRA, C. N.",

ANEXO E

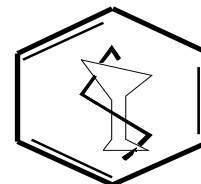
ACCEPTED BY TITLE

- Lipid profile in newly diagnosed people with type 2 diabetes in Albania** AbT-2047
A. Shehu, F. Toti, L. Bruka, A. Doko, K. Hoti (Albania)
- Outbreak of extremely drug-resistant acinetobacter baumannii in patients with diabetes** AbT-2048
S. Ali Dina, R. Sabir, A. Fawwad (Pakistan)
- Association analysis between body weight and management of glucose in Chinese type 2 diabetes patients** AbT-2049
X.L. Cai, X. Jin, J. Wu, Y.L. Chen, X.Y. Han, L.N. Ji (China)
- The impact of obesity indices on predictability of metabolic syndrome** AbT-2050
A. Bener, S. Darwish, A. Al-Hamaq, E.A. Nasralla (Qatar)
- Bariatric surgery: prior history in parents does not mean future intention for children** AbT-2051
R. Kalic, J.A. Curran, E.A. Davis (Australia)
- Safety, tolerability and bioavailability of metformin glycinate in healthy Spanish volunteers** AbT-2052
J. Iglesias, J. Gonzalez-Canudas, Y. Romero-Antonio, R.M. Antonijoan-Arbós (Mexico)
- Metformin and lactic acidosis: coincidence rather than cause** AbT-2053
E.Y. Lee, Y.H. Lee, B.W. Lee, E.S. Kang, C.W. Ahn, B.S. Cha, H.C. Lee (Korea)
- Effects of mifepristone on glycolipid metabolism of type 2 diabetes mellitus in rats** AbT-2054
X.H. Luo, R. Zhang, J. Zhou, C.Y. Wang, R.Y. Xu, X.Y. Ye (China)
- Antidiabetic and antioxidant potential of Couroupita guianensis leaves in streptozotocin induced diabetic rats** AbT-2055
G. Somanj, R. Chaudhari, S. Sathaye (India)
- Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels and Thr325Ile polymorphism in women with polycystic ovary syndrome** AbT-2056
J.C. Albuquerque, F.S. Silva, I.R. Santos, A.L. Cândido, F.R. Oliveira, M.O. Sóter, M.F. Sales, M.O. Sousa, K.B. Gomes, C.N. Ferreira (Brazil)
- Dietary treatment in gestational diabetes mellitus and quality of habitual diet: relation with birth weight** AbT-2057
F.F. Lauszus, A.S. Christensen, H.S. Jensen, J.H. Boris, L. Viggers (Denmark)
- Ankle-brachial index in a sample of diabetic patients** AbT-2058
E. Vazquez Seijas, M.C. Lopez silva, C. Pena Meilan, M.J. Cora Corral, C. Pardo Roibas, P. Gonzalez Gonzalez, M. Sanchez de Enciso Ruiz, C. Rodriguez Fernandez (Spain)

9 Apêndice

APÊNDICE A

**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. CEP: _____

6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____

7.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: _____ Dose: _____

11. Outros medicamentos em uso e dose: _____

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1. Etnia: () Caucasiano () Mestiço: mulato, pardo () Negro () Índio
 () Asiático () mestiço Outros : _____

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 arterial: _____

Medida do quadril: _____

Outras alterações ao exame: _____

Acantose nigra () sim () não

Hirsutismo () sim () não

Tireóide () normal () alterada

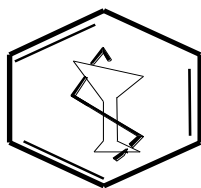
V- CRITÉRIOS SOP

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

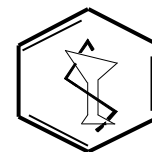
V – EXAMES RECENTES:

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

Médico responsável
(carimbo e assinatura)

APÊNDICE B – 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) 34096895 / 84820894

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

Mirelle Oliveira Sóter –Tel. (35) 38218423 / (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:

____/____/____